

Aus der Medizinischen Klinik I für
Onkologie, Hämatologie,
klinische Immunologie und Rheumatologie
des Universitätsklinikums des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. Michael Pfreundschuh

**Untersuchungen zur Prozessierung und
Präsentation von Melan-A₂₆₋₃₅ im Kontext
des MHC-I-Komplexes mit
MHC-Peptid-spezifischen Antikörpern
und
Evaluation ihrer Bindungskinetiken**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes
2009

vorgelegt von Nina Dauth
geb. am 14.03.1983 in Zweibrücken

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung	10
1	<i>Deutsch</i>	11
2	<i>Englisch</i>	12
II	Einleitung	13
1	<i>Entstehung der Vielfalt an Immunglobulinen</i>	13
1.1	<i>Struktur eines Immunglobulins</i>	13
1.2	<i>Entstehung des Immunglobulinrepertoires</i>	15
2	<i>Struktur des T-Zell-Rezeptors</i>	16
3	<i>Antigenprozessierung und -präsentation über MHC-I-Moleküle</i>	17
3.1	<i>Aufbau und Struktur von MHC-I-Molekülen</i>	17
3.2	<i>Der MHC-I-Weg</i>	17
4	<i>Interaktionen zwischen T-Zell-Rezeptoren und MHC-Peptid-Komplexen</i>	19
5	<i>Offene Fragen</i>	23
5.1	<i>“tumor escape“ Mechanismen</i>	23
5.2	<i>Effizienz und Quantifizierung der Antigenprozessierung und -präsentation</i>	25
6	<i>MHC-Peptid-spezifische Antikörper</i>	26
6.1	<i>Definition</i>	27
6.2	<i>Generierung MHC-Peptid-spezifischer Antikörper</i>	27
7	<i>Prinzipien einer Phagenbibliothek</i>	28
8	<i>Das Melan-A Protein</i>	30
8.1	<i>Melan-A Peptidvarianten</i>	32
9	<i>Ziel der Arbeit</i>	33

III	Material und Methoden	35
1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	35
2	Peptide, Antikörper und Färbereagenzien	38
3	Puffer und Lösungen	40
4	Zellkultur	44
5	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren	45
6	Die Phage-Display Technologie	46
6.1	Phagemidbank	46
6.2	Selektion von Phagen-Antikörpern auf biotinylierte MHC-Komplexe	46
6.2.1	MHC-Peptid-Komplexe	46
6.2.2	Prinzip der Selektion	46
6.2.3	Bestimmung des Phagentiters und Phagenamplifikation	48
6.2.3.1	Bestimmung des Phagentiters (Input und Output)	49
6.2.3.2	Phagenamplifikation	50
6.2.4	Produktion von Phagen in einer 96-Well-Microtiter-Platte	51
6.2.5	ELISA zur Detektion von Phagen-Antikörper-Fragmenten	52
6.2.6	PCR-Amplifikation und Fingerprint der positiven Klone	54
6.2.6.1	Polymerase-Ketten-Reaktion	54
6.2.6.2	Fingerprint der amplifizierten DNA	55
6.2.6.3	Expression und Reinigung löslicher Fab-Antikörper	55
6.2.6.3.1	Expression der löslichen Fab-Antikörper	55
6.2.6.3.2	Reinigung der löslichen Fab-Antikörper	57
6.3	Auftrennung von Proteinen im SDS-PAGE	58
6.3.1	Coomassie-Färbung	59
6.3.2	Westernblot	60
6.3.3	ELISA zur Detektion von aufgereinigten Fab-Antikörpern	62
6.4	Klonierung einer BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion in den Vektor pCES1	62
6.4.1	Herstellung kompetenter Bakterien (CaCl ₂ -Methode)	64
6.4.2	Transformation	65
6.4.3	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	65

6.4.3.1	<i>TENS-Methode</i>	65
6.4.3.2	<i>Isolation von DNA aus Agarosegelen</i>	66
6.4.3.3	<i>Sequenzierung von DNA-Fragmenten</i>	66
6.4.3.4	<i>Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen</i>	67
6.4.3.5	<i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	67
6.5	<i>Oberflächenfärbung von Zellen und Durchflusszytometrie (FACS)</i>	68
6.5.1	<i>Durchflusszytometrie</i>	68
6.5.2	<i>Oberflächenfärbung von Zellen</i>	68
6.5.2.1	<i>Färbung Peptid gepulster Zellen am Beispiel von T2-Zellen</i>	68
6.5.2.2	<i>Färbung von Karzinomzelllinien</i>	70
6.5.2.3	<i>Blockversuche auf Karzinomzelllinien</i>	70
6.5.2.4	<i>Färbung von viral infizierten Zelllinien</i>	71
6.5.3	<i>Quantitative Bestimmung der PE-Moleküle nach Oberflächenfärbung</i>	73
6.6	<i>CTL-Inhibition mittels IFN-γ-ELISA</i>	73
7	<i>Kinetikanalysen mittels Oberflächenplasmonresonanz</i>	75
IV	<i>Ergebnisse</i>	79
1	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse der Selektionen</i>	79
2	<i>Bestimmung der Spezifität der selektionierten Klone</i>	81
2.1	<i>Produktion von Fab-Antikörpern</i>	81
2.2	<i>Bestimmung der spezifischen Reaktivität selektionierter Klone gegen rekombinate MHC-Peptid-Komplexe</i>	82
2.3	<i>Bestimmung der spezifischen Reaktivität selektionierter Klone gegen native, auf Zellen präsentierte MHC-Peptid- Komplexe</i>	85
2.3.1	<i>Reaktivität auf T2-Zellen</i>	85
2.3.2	<i>Reaktivität auf EBV-immortalisierten B-Zellen</i>	91
2.3.2.1	<i>HLA*A-0201 positive EBV-immortalisierte B-Zellen</i>	91
2.3.2.2	<i>HLA*A-0201 negative EBV-immortalisierte B-Zellen</i>	94
2.4	<i>CTL-Inhibition mittels IFN-γ-ELISA</i>	95

3	Sensitivitätsanalysen	97
3.1	<i>Titration der Fab-Antikörper im ELISA</i>	98
3.2	<i>Klonierung einer BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion</i>	100
3.3	<i>Titration der Peptid-Präsentation auf Antigen-präsentierenden Zellen</i>	105
3.3.1	<i>Durchflusszytometrische Analysen mit unbiotinylierten Fab-Antikörpern</i>	106
3.3.2	<i>Durchflusszytometrische Analysen mit biotinylierten Fab-Antikörpern</i>	107
3.3.3	<i>Vergleich zwischen biotinylierten und unbiotinylierten Fab-Antikörpern</i>	108
4	Detektion des MHC-Peptid-Komplexes nach endogener Prozessierung und Präsentation	110
4.1	<i>Detektion des MHC-Peptid-Komplexes auf Tumorzellen</i>	110
4.2	<i>Detektion des MHC-Peptid-Komplexes auf infizierten Zellen</i>	117
5	Bindungskinetik selektionierter Fab-Antikörper	123
5.1	<i>Analyse der Dissoziation der Fab-Antikörper vom MHC-Peptid-Komplex mittels Durchflusszytometrie</i>	124
5.2	<i>Analyse der Peptiddissoziation mittels Durchflusszytometrie</i>	126
5.2.1	<i>Peptiddissoziation auf T2-Zellen</i>	126
5.2.2	<i>Peptiddissoziation auf HLA-A*0201 positiven EBV-immortalisierten B-Zellen</i>	128
5.3	<i>Analyse der Assoziation, Dissoziation und der Affinität mittels Oberflächenplasmonresonanz</i>	130
V	Diskussion	133
1	Spezifität der Fab-Antikörper	133
2	Detektion des endogen prozessierten MHC-Peptid-Komplexes auf Tumorzellen	134
3	Detektion des endogen prozessierten MHC-Peptid-Komplexes auf infizierten Zellen	135

4	<i>Quantifizierung der endogenen Prozessierung und Präsentation</i>	135
5	<i>Änderung der Immunogenität durch A27L-Substitution im Melan-A</i>	139
6	Perspektiven	142
VI	Literaturverzeichnis	145
VII	Publikationen	165
VIII	Danksagung	167
IX	Lebenslauf	169

I Zusammenfassung

1 Deutsch

Das maligne Melanom, auch als schwarzer Hautkrebs bekannt, hat seinen Ursprung in einer malignen Transformation der Melanozyten. Häufig entwickelt sich in Patienten eine Immunantwort gegen diesen Tumor. Ein besseres Verständnis der Immunbiologie des malignen Melanoms erfolgte mit der Identifikation von spezifischen Tumorantigenen. Eines dieser Antigene stellt das Melan-A Protein dar, ein linienspezifisches Differenzierungsantigen, welches sowohl in gesunden Melanozyten als auch in Zellen des malignen Melanoms gefunden wird. Die Immunantwort wird durch zytotoxische T-Zellen ausgeführt, sie binden an Peptide, die durch Major-Histokompatibilitäts-Komplexe (MHC) auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Im Fall von Melan-A konnte ein Kontext des MHC-Allels HLA-A*0201 präsentiertes Peptid identifiziert werden, das Melan-A₂₆₋₃₅ EAA (EAAGIGILTV). Ferner konnten Peptidvarianten identifiziert werden, welche sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als immunogener erwiesen haben. Dies gilt in erster Linie für die Peptidvariante Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA (ELAGIGILTV). Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Generierung und Charakterisierung von Antikörpern, welche Melan-A₂₆₋₃₅ EAA im Kontext von HLA-A*0201 erkennen. Die Selektion der Fab-Antikörper erfolgte mittels Phage Display Technologie unter Verwendung einer Antikörper-Bank, welche ein humanes naives Fab-Repertoire präsentiert. Es wurden zwei Fab-Antikörper identifiziert, E6 und H4, die hochspezifisch, analog einem T-Zell-Rezeptor, mit dem Melan-A₂₆₋₃₅/HLA-A*0201 Komplex interagieren. Es wurde ferner die Effizienz der Prozessierung des Melan-A₂₆₋₃₅/HLA-A*0201 Komplex untersucht. Zellen wurden mit rekombinanten Vaccinia Viren infiziert, die für das an ein Reporter-Protein gekoppelte Melan-A Protein kodierten. Es müssen 2.600 Proteine synthetisiert werden, bis ein MHC-Peptid Komplex präsentiert wird. Die Antigenprozessierung des Peptides ist somit ein extrem ineffizienter Prozess. Mit Oberflächenplasmonresonanz erfolgte eine vergleichende Kinetikmessung der beiden Fab-Antikörper. Obwohl selektioniert, um gegen EAA zu binden, interagierten beide Fab-Antikörper mit höherer Affinität mit der immunogeneren Peptidvariante. Die Ergebnisse suggerieren, dass die A27L-Substitution eine Peptid-spezifische Bindung mit dem MHC-Peptid-Komplex erlaubt und damit die höhere Immunogenität von Peptid-Varianten erklären könnte.

2 *Englisch*

Melanoma is a very aggressive skin cancer. Due to its early lymphatic and vessel invasion, there can be a complete surgical invention in only a few cases. Nevertheless, in many cases one can detect an immune response by cytotoxic T lymphocytes. Better understanding of the immunobiology of melanoma was achieved by the identification of specific tumor antigens, such as Melan-A. It represents a lineage-specific antigen which is found in melanocytes and melanoma cells as well. Melan-A specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) recognize peptide fragments that are presented in the context of so-called major histocompatibility complexes (MHC) on the cell surface. By now there have been identified four antigenic peptides which are presented in the context of HLA-A*0201. The immunodominant peptide is called Melan-A₂₆₋₃₅ EAA (EAAGIGILTV). Further investigations identified synthetic peptide analogues such as Melan-A₂₆₋₃₅ ELA (ELAGIGILTV), which are more immunogenic and elicit tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes more efficiently both *in vitro* and *in vivo*. The objective of this study was the generation and characterization of antibodies specific for Melan-A₂₆₋₃₅ EAA in the context of HLA-A*0201. The generation of these was based on the Phage Display technology using a phagemid library expressing a large non-immune human Fab repertoire. Overall there were two anti-bodies, E6 and H4, which proofed to be specific for the recombinant Melan-A₂₆₋₃₅/HLA-A*0201 complex as well as for the naturally processed and presented complex. These antibodies allowed us to directly detect and furthermore quantitate naturally processed MHC class I antigen-peptide complex on the surface. To study the efficacy of processing the Melan-A₂₆₋₃₅/HLA-A*0201 complex we infected cells with recombinant vaccinia virus encoding for GFP-ubiquitin linked Melan-A A27L. After quantitating both the intracellular number of synthesized Melan-A proteins and on the surface presented Melan-A₂₆₋₃₅/HLA-A*0201 complex we were able to show that among 2.600 peptides synthesized one is displayed in context of HLA-A*0201 complex. So antigen processing is a very inefficient process. Using the method of surface plasmon resonance were furthermore performed kinetic measurements. Both antibodies, though selected against the EAA peptide, revealed a very higher affinity to the ELA peptide. These results suggest that the A27L substitution in ELA allows a more stable interaction of antibody and MHC what may explain the enhanced immunogenicity of ELA in regard of T cell activation.

II Einleitung

Das Immunsystem gliedert sich in einen angeborenen, das heißt innaten Teil und in einen erworbenen, das heißt adaptiven Teil. Das innate Immunsystem reagiert schnell und unspezifisch auf Erreger. Im Gegensatz dazu basiert die adaptive Immunität auf selektiver klonaler Expansion, die Haupteffektorzellen sind in diesem Fall B- und T-Zellen. Die Rezeptoren von B-Zellen stellen Immunglobuline dar, die überwiegend mit unprozessierten Proteine und Glykoproteinen interagieren. T-Zellen erkennen mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) Antigene, die zu Peptiden prozessiert und von Major-Histokompatibilitäts-Komplexen (MHC) präsentiert werden.

1 *Entstehung der Vielfalt an Immunglobulinen*

1.1 *Struktur eines Immunglobulins*

Immunglobuline sind die sezernierte Form des B-Zell-Rezeptors und bis auf einen kleinen Teil am Carboxylende der konstanten Region mit ihm identisch. Immunglobuline besitzen ungefähr die Form eines „Y“ und bestehen aus drei gleich großen Abschnitten, welche flexibel miteinander verbunden sind. Diese Struktur ermöglicht es ihnen, ihre beiden Funktionen zu erfüllen: Einerseits die spezifische Bindung des Antigens sowie andererseits die Wechselwirkung mit Effektormolekülen und Zellen. Dabei kommt jede Aufgabe einem anderen Teil des Immunglobulinmoleküls zu: Die Antigenerkennung und –bindung erfolgt im variablen (für das Antigen spezifischen) Teil, der V-Region, die Wechselwirkung mit Effektoren im konstanten Teil des Immunglobulins. Innerhalb der Gruppe der Immunglobuline unterscheidet man anhand ihrer jeweiligen konstanten Region verschiedene Klassen: IgM, IgG, IgA, IgD sowie IgE.

Strukturelle Merkmale eines Immunglobulins werden im Folgenden am Beispiel des IgG dargestellt:

IgG-Moleküle sind mit einer relativen Molekülmasse von 150 kDa große Moleküle und aus jeweils zwei unterschiedlichen Polypeptidketten zusammen gesetzt: Zwei schwere (*heavy*) H-Ketten, mit einem Gewicht von je ca. 50 kDa, sowie zwei leichte

(*light*) L-Ketten, mit einem Gewicht von je ca. 25 kDa, welche untereinander durch Disulfidbrücken verbunden sind. Es existieren zwei Typen von leichten Ketten, Lambda- (λ -) und Kappa- (κ -) Ketten, wobei pro IgG-Molekül jeweils nur einer der beiden Typen vorkommt.

Die Analyse der Aminosäuresequenz der leichten und schweren Ketten zeigt, dass die aminoterminal Proteindomäne von leichter und schwerer Kette zwischen verschiedenen Immunglobulinen erheblich variiert, wohingegen die übrigen Domänen innerhalb einer Klasse relativ konstant sind. Die beiden sehr variablen Domänen werden somit als jeweilige V-Region (V_H bzw. V_L) und die übrigen relativ konstanten Domänen als C-Region (C_H bzw. C_L) bezeichnet.

Es ergibt sich demnach folgende Struktur eines IgG-Moleküls:

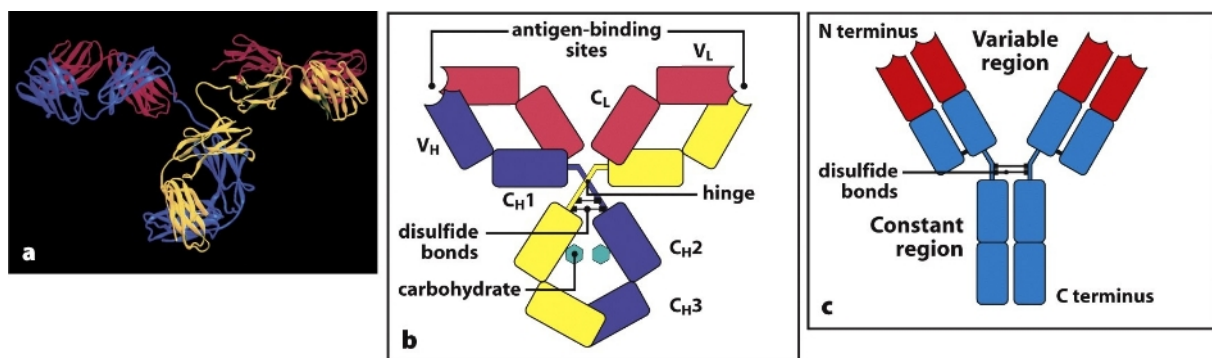


Abbildung 1: kristallographische sowie schematische Darstellung eines Immunglobulins (aus: Janeway's Immunobiology, 7th. Edition)

Vergleicht man die Sequenzen der V-Domäne vieler Immunglobuline, fallen sowohl in V_H - als auch in der V_L -Domäne drei besonders variable Regionen auf. Diese werden als hypervariable Regionen HV1, HV2 und HV3 bezeichnet. Der Rest der V-Domäne wird demzufolge als Gerüstregionen (*framework regions*) FR1, FR2, FR3 und FR4 bezeichnet. Es bilden jeweils die β -Faltblätter die Gerüstregion, die hypervariablen Regionen werden von den Schleifen dazwischen gebildet. Legen sich nun die V_H - und die V_L -Domäne aneinander, kommen genau die hypervariablen Schleifen der beiden Domänen nebeneinander zu liegen, was letztlich zur Entstehung eines einzigartigen hypervariablen Bereiches am Ende jedes Armes führt: Der Antigenbindungsstelle. Die Antigenpezifität wird letztlich durch die Oberflächenstruktur der hypervariablen Schleifen beider Ketten bestimmt, welche zum Antigen komplementär

ist. Diese werden folglich als komplementaritätsbestimmende Regionen (*complementary determining regions*) CDR1, CDR2 und CDR3 bezeichnet.

Mittels proteolytischer Spaltung durch Papain kann das IgG-Molekül in drei Stücke zerlegt werden: Ein Fc-Fragment, welches die C_H2- und C_H3-Region der beiden schweren Ketten enthält, sowie zwei Fab-Fragmente, welche jeweils die vollständige leichte Kette sowie die C_L- und C_H1-Region der schweren Kette enthalten und somit den beiden Armen des Moleküls entsprechen.

Pepsin spaltet das IgG-Molekül in der gleichen Region wie Papain, jedoch auf der carboxyterminalen Seite der Disulfidbrücken. Es entsteht nach proteolytischer Spaltung somit das sogenannte F(ab')₂-Fragment, in dem beiden antikörperbindenden Arme des IgG miteinander verbunden sind. Der Rest der schweren Kette wird in mehrere kleine Fragmente geschnitten. Das F(ab')₂-Fragment besitzt die gleichen Bindungseigenschaften wie das ursprüngliche IgG-Molekül, kann jedoch nicht mit Effektormolekülen in Wechselwirkung treten.

1.2 *Entstehung des Immunglobulinrepertoires*

Die vollständige Sammlung von Immunglobulinspezifitäten in einem Individuum nennt man Immunglobulinrepertoire, es umfasst beim Menschen ca. 10^{11} verschiedene Moleküle. Dies beruht auf einer Vielzahl möglicher V-Domänen in einem Immunglobulinmolekül. Die V-Domänen einer leichten oder schweren Kette werden dabei von jeweils mehr als einem Gensegment kodiert. Im Fall der leichten Kette kodieren zwei DNA-Abschnitte für die V-Domäne, das V- und das J-Gensegment. Durch Verknüpfung der beiden Abschnitte entsteht ein durchgehendes Exon, was gleichzeitig näher an dem für die konstante Region codierenden DNA-Abschnitt liegt. Im Fall der schweren Kette wird die V-Domäne von drei DNA-Abschnitten kodiert. Zu dem V- und J-Segment kommt noch ein im Genom dazwischen liegendes D-Segment hinzu. Bei der somatischen Rekombination wird hierbei zuerst ein D- mit einem J-Segment verknüpft und erst danach lagert sich ein V-Segment an die DJ-Sequenz an, so dass letztlich auch hier ein vollständiges Exon für die variable Region der schweren Kette entsteht (Grawunder et al., 1998). Es muss sowohl im Fall der

leichten als auch der schweren Kette berücksichtigt werden, dass jedes Gensegment in multiplen Kopien vorliegt und bei jeder somatischen Rekombination zufällig eine ausgewählt wird.

Neben der zufälligen Verknüpfung der jeweiligen V- und J- bzw. V-, J- und D-Segmente, was als kombinatorische Vielfalt bezeichnet wird, kann im Zuge des Rekombinationsvorganges durch Hinzufügen oder Entfernen von Nukleotiden an den Verknüpfungsstellen der einzelnen Gensegmente eine junktionale Vielfalt erzielt werden. Eine weitere kombinatorische Vielfalt besteht darin, dass sich variable Regionen der leichten und schweren Ketten in unterschiedlichen Kombinationen paarweise zur Antigenbindungsstelle zusammen lagern. Allein diese genannten Mechanismen erzeugen theoretisch eine Vielfalt von 10^{11} verschiedenen Immunglobulinmolekülen (Weigert et al., 1980).

Ein weiterer Mechanismus kann schließlich die Vielfalt weiter erhöhen: Die somatische Hypermutation. Diese sorgt in der gesamten variablen Region für Vielfalt und findet in B-Zellen in peripheren lymphatischen Organen statt, nachdem bereits funktionstfähige Immunglobuline erzeugt wurden. Dabei werden in die variablen Regionen bereits umgeordneter Gene in großem Umfang Punktmutationen eingeführt, so dass letztlich mutierte B-Zell-Rezeptoren auf der Zelloberfläche erscheinen (Tomlinson et al., 1996).

2 *Struktur des T-Zell-Rezeptors*

Jede T-Zelle besitzt etwa 30.000 Antigenrezeptoren auf ihrer Oberfläche, welche für die Antigenerkennung verantwortlich sind. Dabei besteht jeder Rezeptor aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, der α - und der β -Kette, welche analog zu den Ketten im Immunglobulinmolekül durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Das resultierende α : β -Heterodimer ähnelt strukturell wie auch in seiner dreidimensionalen Struktur dem Fab-Fragment des Immunglobulinmoleküls. Ein Minderheit an T-Zellen trägt einen strukturell ähnlichen, jedoch aus einer γ - und δ -Kette bestehenden γ : δ -T-Zell-Rezeptor. Dieser scheint andere Antigenerkennungseigenschaften zu besitzen, jedoch ist seine Funktion noch nicht vollständig geklärt.

3 *Antigenprozessierung und -präsentation über MHC-I-Moleküle*

Das wichtigste Merkmal der Antigenerkennung durch T-Zellen ist die Form des Liganden, der vom TCR erkannt wird. Dieser besteht aus einem Peptid, aus einem körperfremden Antigen stammend, das in der peptidbindenden Furche eines MHC-Moleküls gebunden ist. Das MHC-I-Molekül bindet dabei das Peptid intrazellulär und befördert es an die Zelloberfläche.

3.1 *Aufbau und Struktur von MHC-I-Molekülen*

MHC-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, die höchste Expression findet man jedoch auf hämatopoetischen Zellen. Die Moleküle dieser Klasse bestehen aus zwei Polypeptidketten: eine größere im MHC-Genlocus kodierte α -Kette sowie das kleinere nicht im MHC-Genlocus kodierte β 2-Mikroglobulin (White et al., 1999). Das β 2-Mikroglobulin wird dabei nichtkovalent der α -Kette, welche die Zellmembran durchspannt, angelagert. Das vollständige MHC-Molekül besitzt schließlich vier Domänen, wobei drei davon von der α -Kette und eine vom β 2-Mikroglobulin gebildet werden. Dabei haben die α 3-Domäne sowie die des β 2-Mikroglobulin eine den Immunglobulinen sehr ähnliche Struktur, die Domänen α 2 und α 3 bilden die Wände eines Spaltes auf der Moleküloberfläche (Catipovic et al., 1994; Fremont et al., 1992). Dieser Spalt stellt letztlich die peptidbindende Stelle des MHC-Moleküls dar, dort befinden sich die für die Antigenvariabilität verantwortlichen Polymorphismen (Johansen et al., 1997).

3.2 *Der MHC-I-Weg*

Liganden für MHC-I-Moleküle können verschiedenen Quellen entstammen, beispielsweise zytosolische Proteine endogener oder viraler Herkunft, defekte Proteine

aus der Translation (DriPs, *defective ribosomal products*) oder auch durch Endozytose ins Zytosol transportierte Proteine. Im Zytosol befindliche Proteine, welche für die MHC-I-Präsentation vorgesehen sind, gelangen nach Ubiquitinilierung in das Proteasom, bestehend aus einem großen multikatalytischen Proteasenkomplex aus vier Ringen zu je ungefähr sieben Untereinheiten mit einem röhrenförmigen Zentrum. Dort werden die jeweiligen Proteine in einzelne 10-20 Aminosäuren lange Peptide gespalten, im Zytosol anschließend durch dortige Proteasen am N-terminalen Ende nachbearbeitet und schließlich in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert. (Niedermann et al., 1999; York et al., 1999). Dieser Transport kann ATP-abhängig oder –unabhängig geschehen. Der ATP-abhängige Weg erfolgt überwiegend mittels zweier Transportproteine, welche als TAP-1 und TAP-2 (*transporters associated with antigen processing*) bezeichnet werden. Im ER schließlich erfolgt eine letzte Bearbeitung der Peptide, bevor diese dann an neu synthetisierte MHC-I-Moleküle binden. Dazu muss sich zuerst das β 2-Mikroglobulin an die MHC-I- α -Kette anlagern, dann kann das Peptid gebunden werden. Der nun vollständige MHC-Peptid-Komplex kann schließlich das ER verlassen und wird über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Hierbei können nur solche MHC-I-Moleküle an die Zelloberfläche gelangen, welche ein Peptid gebunden haben. Dies konnte mit Hilfe TAP-defizienter Zellen gezeigt werden, welche trotz korrekter Synthese der MHC-Moleküle nur sehr wenige MHC-I-Peptid-Komplexe auf ihrer Zelloberfläche besitzen (Yewdell et al., 1999). Beim Menschen lagern sich neu synthetisierte α -Ketten im ER mit einem Chaperon-Protein namens Calnexin zusammen. Nach Assoziation mit dem β 2-Mikroglobulin dissoziiert das Heterodimer von Calnexin, lagert sich an einen größeren Protein-Komplex an und löst sich von diesem erst wieder nach erfolgter Bindung eines Peptids (Li et al., 2000; Pamer & Cresswell, 1998; Stern & Wiley, 1994).

MHC-I-Moleküle präsentieren nicht nur, wie lange vermutet wurde, endogen erzeugte Peptide, sondern auch solche exogener Herkunft. Diese Tatsache wird allgemein als *cross presentation* bezeichnet. Man geht heute davon aus, dass diesem Mechanismus eine Hauptaufgabe in der MHC-I-abhängigen Immunantwort gegen Tumorantigene zukommt (Sigal et al., 1999). Bezüglich der Art und Weise, wie exogene Antigene die Endozytosevesikel überwinden, um dem MHC-I-Weg zugeführt zu werden,

gibt es bis heute verschiedene Theorien: Zum einen „verlieren“ Endozytosevesikel immer einen Teil ihres Inhalts in Zytoplasma bzw. sie beinhalten Transporter in ihrer Membran (Ackerman & Cresswell, 2004; Rodriguez et al., 1999), ferner können internalisierte Partikel in das ER gelangen und mittels Proteintransfer schließlich in das Zytoplasma (Tsai et al., 2002). Des Weiteren ergaben Analysen, dass einige Komponenten des ER, darunter auch Tapasin sowie TAP, Bestandteile der Membran des Phagosoms sein könnten (Gagnon et al., 2002), so dass folglich exogene Proteine bereits innerhalb des Phagosoms Zugang zur ER-abhängigen MHC-I-Beladung erhalten (Desjardins, 2003; Guernonprez et al., 2003; Houde et al., 2003).

4 *Interaktionen zwischen T-Zell-Rezeptoren und MHC-Peptid-Komplexen*

Im Gegensatz zu B-Zell-Rezeptoren, welche auch mit Aminosäuren eines Proteins, welche erst durch Faltung dessen nebeneinander zu liegen kommen, in Kontakt treten können, können T-Zell-Rezeptoren nur mit kurzen zusammenhängenden Aminosäuresequenzen eines Proteins reagieren. Des Weiteren muss ein Antigen an ein MHC-I- oder MHC-II-Molekül gebunden sein, um von einem T-Zell-Rezeptor erkannt zu werden. Dabei befindet sich das Antigen in Form eines Peptides in einer Tasche an der Oberfläche des MHC-Moleküls, was im Folgenden dargestellt ist:

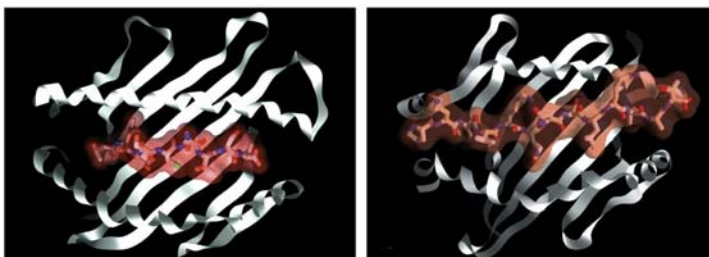


Abbildung 2: kristallographische Darstellung der Antigenbindung in einem MHC-I- (linkes Bild) sowie MHC-II-Molekül (rechtes Bild) (aus: Janeway's Immunobiology, 7th. Edition)

Der T-Zell-Rezeptor tritt sowohl mit dem Peptid als auch mit dem jeweiligen MHC-Molekül in Kontakt. Dabei kann eine für MHC-I- und MHC-II-Peptid-Komplexe ähnli-

che Orientierung des T-Zell-Rezeptors festgestellt werden, welche am Beispiel eines MHC-I-Peptid-Komplexes im Folgenden dargestellt ist:

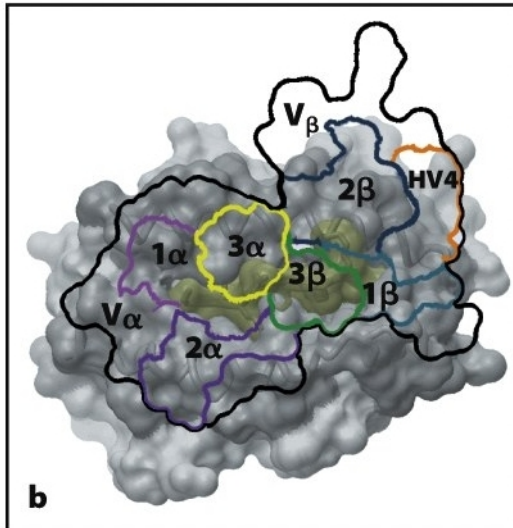


Abbildung 3: „Fußabdruck“ (schwarze Linie) eines T-Zell-Rezeptors auf einem MHC-I-Peptid-Komplex: Antigen in mattgelb; CDR1 α in hellviolett, CDR2 α in dunkelviolett, CDR3 α in gelb, CDR1 β in hellblau, CDR2 β in dunkelblau, CDR3 β in grün, HV4-Schleife der β -Kette in orange (aus: Janeway's Immunobiology, 7th. Edition)

Die Abbildung zeigt einen „Fußabdruck“ des T-Zell-Rezeptors auf einem MHC-I-Komplex mit Blick von oben. Es zeigt sich, dass sich der T-Zell-Rezeptor diagonal über der Peptid-bindungsfurche ausrichtet, so dass die V_α -Domäne über dem N-terminalen Ende des Peptides und die V_β -Domäne über dem C-terminalen Ende zu liegen kommt. Ferner lässt sich erkennen, dass die Bindung an das Peptid hauptsächlich durch die CDR3-Domänen von α und β -Kette hergestellt wird, welche gleichzeitig die Domänen mit der größten Variabilität darstellen. Dagegen stehen die in ihrer Sequenz relativ konservierten

CDR1 α - und CDR2 α -Domänen mit den α -Helices des MHC-Moleküls in Kontakt.

Man geht davon aus, dass sich der T-Zell-Rezeptor dem MHC-Peptid-Komplex primär in grober diagonalen Richtung nähert und eine erste Bindung eingeht und schließlich, bedingt durch Wechselwirkungen der CDR-Domänen mit der Oberfläche, die endgültige Position einnimmt. Dabei scheint der Raum, in dem eine Bewegung und Umlagerung des T-Zell-Rezeptors stattfinden kann, insofern limitiert zu sein, als bisher keine Drehung um mehr als 180° beobachtet wurde (Garcia et al., 1996; Reinherz et al., 1999; Sim et al., 1997). Dies würde gleichzeitig ausschließen, dass die V_α -Domäne über dem C-Terminus und die V_β -Domäne über dem N-Terminus des Peptides zu liegen kommt.

Die bisher beschriebene Interaktion zwischen dem MHC-Peptid-Komplex und dem T-Zell-Rezeptor stellt den ersten Schritt dar im Aufbau einer so genannten immunologischen Synapse. Diese umfasst ferner die als Co-Rezeptoren bezeichneten Moleküle CD4 und CD8 sowie ein zusätzliches Signalmolekül, das CD3-Molekül. Ihre Funktion als Co-Rezeptoren erhalten die beiden Moleküle CD4 und CD8 aufgrund der Tatsache, dass sie einerseits mit dem T-Zell-Rezeptor assoziieren, andererseits an un-

ränderliche Stellen des jeweiligen MHC-Moleküls binden und schließlich erst durch ihre Bindung eine effiziente Reaktion der T-Zelle möglich wird.

Das CD8-Molekül kommt als Homo- oder Heterodimer vor, wobei zum gegenwärtigen Zeitpunkt das Heterodimer der tatsächliche Co-Rezeptor zu sein scheint. Dieses besteht aus einer α - und einer β -Kette, welche durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Jede Kette besteht dabei aus einer einzelnen immunglobulinartigen Domäne, welche über eine gestreckte Polypeptidkette mit der Zellmembran verbunden ist. Kristalline Strukturen wurden bisher jedoch nur von dem Homodimer aus zwei α -Ketten angefertigt: Dieses bindet einerseits primär im Sinne eines Antikörpers an die $\alpha 3$ -Domäne des MHC-I-Moleküls und tritt andererseits mit Resten an der Basis der $\alpha 2$ -Domäne in Wechselwirkung. In Folge dessen liegt die oben liegende Oberfläche des MHC-Moleküls frei und kann gleichzeitig mit dem T-Zell-Rezeptor interagieren (Gangadharan & Cheroutre, 2004; Gao et al., 1997; Kern et al., 1998).

Das CD4-Molekül stellt ein einkettiges Molekül aus vier immunglobulinartigen Domänen dar, wobei jeweils zwei Domänen (D1 und D2 sowie D3 und D4) zu einem festen Stab gepackt sind. Beide sind über ein flexibles Gelenk miteinander verbunden. Dabei bindet die erste Domäne D1 das MHC-II-Molekül an einer der CD8-Bindungsstelle analogen Stelle. Durch gleichzeitige Bindung von CD4 und T-Zell-Rezeptor an denselben MHC-Peptid-Komplex erhöht sich die Empfindlichkeit der T-Zelle für das Antigen und die zur Aktivierung der T-Zelle benötigte Antigenmenge sinkt auf ein Hundertstel (Wang et al., 2001).

Ferner kann CD4 über eine Stelle in der Domäne D4 Homodimere bilden. Da die MHC-Bindungsstelle bei dieser Dimerisierung frei bleibt, können auf diese Weise zwei MHC-Moleküle und folglich auch zwei T-Zell-Rezeptoren miteinander vernetzt werden (Gao et al., 1997).

CD4 und CD8 ist gemein, dass sie stark mit einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase namens Lck interagieren, wodurch diese nahe an die signalisierenden Bestandteile des T-Zell-Rezeptors gebracht wird. Als Folge kann das durch Interaktion mit dem MHC-Peptid-Komplex entstandene Signal um ein Vielfaches verstärkt werden (Zamojska, 1998).

Es ist bekannt, dass nicht jede Interaktion eines MHC-Peptid-Komplexes mit einem T-Zell-Rezeptor zur Aktivierung der T-Zelle führt. Geringe Änderungen in der Amino-

säuresequenz des Peptids können aus einem Agonisten einen Antagonisten erzeugen und somit eine T-Zell-Antwort gar vollständig unterbinden (Collins & Frelinger, 1998; Sloan-Lancaster & Allen, 1996). Lange wurde vermutet, dass unterschiedliche T-Zell-Antworten mit strukturellen Unterschieden begründet werden können. Tatsächlich können Kristallstrukturen die möglichen Signalkaskaden nicht erklären. Man muss jedoch kritisch bemerken, dass die aktuell verfügbaren Kristallstrukturen lediglich den Endpunkt des Bindungsprozesses der T-Zell-Rezeptoren darstellen. Der Punkt, an dem der T-Zell-Rezeptor das Antigen erkennt und die daraus resultierende Signalkaskade „ausgewählt“ wird, liegt dagegen zu Beginn des Interaktionsprozesses. Die frühe Interaktion von T-Zell-Rezeptor mit dem MHC-Peptid-Komplex kann aktuell noch als weitgehend unbekannt angesehen werden und steht somit weiterer Analysen offen.

Aufgrund der Vielzahl an verfügbaren Antigenen bedarf es auf der Seite der T-Zelle eines schnell ablaufenden Mechanismus, mit welchem einerseits fremde von körpereigenen Antigenen unterschieden werden und andererseits bei ausreichender Affinität des T-Zell-Rezeptors zu dem jeweiligen Antigen eine Bindung mit anschließender T-Zell-Aktivierung ausgelöst wird. Hierzu existieren verschiedene Theorien, darunter die einer sich in zwei Schritten vollziehenden Bindung: Diese beruht auf einem ersten Komplex zwischen T-Zell-Rezeptor und den α_1 - und α_2 -Helices des MHC-Moleküls, gefolgt von einer intensiveren Bindung zwischen dem sich in der Bindungsfurche befindlichen Antigen und den CDR3-Domänen des T-Zell-Rezeptors (Wu et al., 2002). Im Fall eines MHC-II-Moleküls mit einem relativ tief in der Bindungsfurche liegenden Antigen erscheint diese Theorie durchaus realistisch, wohingegen im Fall des MHC-I-Moleküls aufgrund des weit an der Oberfläche liegenden Antigens von einer simultanen Bindung an MHC-Molekül und Antigen ausgegangen werden muss (Tynan et al., 2005).

Man vermutet, dass Unterschiede in der Kinetik der Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-Peptid-Komplex dafür verantwortlich sind, dass variable Aktivierungen von T-Zellen entstehen. Eine T-Zelle muss ausreichend lange an einen MHC-Peptid-Komplex binden, um eine Signalkaskade in Gang zu setzen. Dies impliziert, dass eine Bindung von sehr kurzer Dauer ineffizienter ist, verglichen mit einer Bindung mit längerer Halbwertszeit (McKeithan, 1995). Eine Erweiterung dieser Theorie besagt, dass die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor und dem MHC-Peptid-

Komplex jedoch nur eine maximale Dauer erreichen darf, um mehreren T-Zell-Rezeptoren die Möglichkeit zu eröffnen, mehrmals an denselben MHC-Peptidkomplex zu binden und eine Signalkaskade in Gang zu setzen (Valitutti et al., 1995). Diese Hypothese führte letztlich zu der Annahme eines relativ engen Zeitfensters einer optimalen T-Zell-Aktivierung mit der Konsequenz, dass jegliche Bindungen, die außerhalb dieses Fensters liegen, sich negativ auf die T-Zell-Aktivierung auswirken (Kalergis et al., 2001). Jedoch existieren Beobachtungen, welche die bisher angeführten Theorien nicht zu unterstützen vermögen: So findet man bei T-Zellen mit mutierten T-Zell-Rezeptoren, welche sich durch eine um den Faktor 15-45 geringeren Dissoziationszeit von dem MHC-Peptid-Komplex auszeichnen, eine gleichartige Reaktivität als bei solchen T-Zellen mit dem nativen, nicht mutierten T-Zell-Rezeptor (Holler et al., 2001; Weber et al., 2005).

Man weiß des Weiteren, dass T-Zell-Rezeptoren zwischen Antigenen im Kontext eines MHC-Komplexes differenzieren können, welche sich lediglich in einer Aminosäure unterscheiden. Ferner können solche Antigene völlig unterschiedliche Reaktionskaskaden induzieren, wenn sie von einer T-Zelle erkannt werden (Germain, 2003).

5 Offene Fragen

5.1 “tumor escape“ Mechanismen

Auch Tumorzellen präsentieren T-Zellen Peptide von Tumorzellproteinen über MHC-Moleküle. Obwohl diese eine T-Zell-Antwort im Sinne einer anti-Tumor-Reaktion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auslösen können, bleibt die Destruktion des Tumors durch das Immunsystem eine seltene Ausnahme. Experimente mit Mäusen zeigten gar, dass die Tumorfrequenz bei solchen Mäusen, die keine Lymphozyten besitzen, nicht höher liegt als bei jenen mit intaktem Immunsystem. Eine Ausnahme bilden hier allerdings virusassoziierte Tumoren, die sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen mit defektem Immunsystem gehäuft auftreten.

Die Mechanismen, mit denen Tumorzellen einer effektiven Immunantwort entgehen, werden als „*tumor escape*“ Mechanismen bezeichnet. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Tumorzelle dem Immunsystem als normale Körperzelle erscheint, indem sie keine Peptide neuer, mutierter Proteine auf ihrer Oberfläche präsentiert. Des Weiteren kann sie sich durch einen Verlust oder eine Modulation von MHC-Molekülen (Aptsiauri et al., 2007; Koopman et al., 2000; Koopman et al., 1999), TAP (Cromme et al., 1994; Korkolopoulou et al., 1996) oder auch tumor-assoziierten Antigenen der Erkennung durch Zellen des Immunsystems entziehen. Ferner kann durch eine verminderte Expression kostimulatorischer Moleküle (Chen et al., 1994) eine Anergie in Tumor-spezifischen T-Zellen induziert werden (von Leoprechting et al., 1999). Weitere Möglichkeiten sind einerseits die Abtötung von CD8⁺ T-Zellen, was durch eine FasL-Expression in den Tumorzellen (Whiteside & Rabinowich, 1998) gelingt, oder andererseits die Unterdrückung der Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch Sekretion bestimmter Zytokine.

Es existiert ferner eine weitere Option, die es den Tumorzellen ermöglicht, sich einer Immunantwort zu entziehen: der Stat3-Mechanismus. Stats (*signal transducer and activators of transcription*) stellen zytoplasmatische Transkriptionsfaktoren dar und sind an vielen Aspekten von Zellwachstum und Proliferation beteiligt. Es sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt eine Vielzahl an Stat-Molekülen bekannt; allen gemein ist ein charakteristischer Aktivierungsweg (sogenannter JAK-Stat-Weg), in dessen Folge letztlich ein extrazelluläres Signal in den Zellkern überführt wird, um dort die Expression diverser Gene zu beeinflussen. Im Fall des Proteins Stat3 konnte gezeigt werden, dass es in einer Reihe von Tumoren, sowohl hämatopoetischen als auch epithelialen Ursprungs (Bowman et al., 2000; Buettner et al., 2002), zu einer Aktivierung kommt. Aktiviertes Stat3 ist einerseits in der Lage, die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen zu unterdrücken und besitzt andererseits die Möglichkeit, die Freisetzung solcher Faktoren, welche die Maturation dendritischer Zellen inhibieren, zu steigern (Bowman et al., 2000). Folglich wird durch aktiviertes Stat3 die T-Zell-Antwort gegen Tumorzellen unterdrückt (Cheng et al., 2003; Wang et al., 2004). Ferner konnte gezeigt werden, dass es nach Blockade der Stat3-Aktivierung zu einer geringeren Expression solcher für Proliferation und Überleben von Tumorzellen erforderlichen Gene kommt (Bowman et al., 2001; Catlett-Falcone et al., 1999; Epling-Burnette et al., 2001; Sinibaldi et al., 2000), *in vivo* konnte gar ein Wachstumsstop bzw. eine Regression nachgewiesen werden (Niu et al., 1999).

Zwar sind bereits vielfältige Mechanismen bekannt, mit denen sich Tumorzellen dem Angriff des Immunsystems entziehen können, es scheint jedoch noch eine Vielzahl an weiteren Mechanismen zu existieren, welche zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht charakterisiert worden sind.

5.2 *Effizienz und Quantifizierung der Antigenprozessierung und -präsentation*

Im Fall des MHC-Klasse-I-Weges haben sich bereits eine Vielzahl an Arbeitsgruppen mit der Frage der Effizienz der Antigenprozessierung und –präsentation beschäftigt. Es lässt sich feststellen, dass der Prozess, an dessen Ende die Beladung von MHC-I-Molekülen mit Peptiden steht, keineswegs einer fehlerfreien und zügig ablaufenden Verkettung einzelner Reaktionsschritte gleicht. Vielmehr können viele dem Proteasom entstammende Peptide aufgrund Längen- oder Sequenzinkompatibilitäten nicht an MHC-I-Moleküle binden (Cascio et al., 2001). So produziert das Proteasom Peptide mit einer Länge von 4-20 Aminosäuren, jedoch können beispielsweise Peptide mit einer Länge unter acht Aminosäuren nur sehr ineffizient mit TAP interagieren und erhalten somit keinen Zugang zum ER (Momburg et al., 1994). Zu große Peptide müssen in der Folge zusätzlich modifiziert werden, um letztlich an MHC-I-Moleküle binden zu können. Dies geschieht im ER mittels der ER-Aminopeptidase ERAP1 (Saric et al., 2002; Serwold et al., 2002), welche die zu langen Peptide vom Aminoende ausgehend in eine für das MHC-I-Molekül adäquate Länge bringt. Die schließlich resultierenden Peptide müssen in der Folge erneut in den *MHC-I loading complex* gelangen, was insofern ein Hindernis darstellt, als Peptide, welche sich ungebunden im Lumen des ER befinden, entweder mit Chaperonen (Lammert et al., 1997; Spee & Neefjes, 1997) interagieren können oder aber mittels des Transporters SEC61 Translocon rasch ins Zytoplasma zurück transportiert werden (Koopmann et al., 2000).

Man schätzt, dass insgesamt etwa 60% der dem Proteasom entstammenden Peptide zu klein, etwa 25% zu groß und nur etwa 15% von angemessener Größe sind, um direkt an eine MHC-I-Molekül gebunden zu werden (Cascio et al., 2001). Ferner schätzt man, dass etwa 99% der intrazellulär synthetisierten Peptide degradiert werden, noch bevor sie Zugang zu einem TAP erhalten: *In vivo* entfernen zytosolische

Aminopeptidasen alle 2-3 Sekunden einen Aminosäurerest. Folglich muss ein Peptid bereits wenige Sekunden, nachdem es synthetisiert wurde, mit TAP interagieren, um als Antigen präsentiert zu werden.

Princotta et. al (Princiotta et al., 2003) analysierten sowohl den Aspekt der Proteinsynthese und –degradation als auch mikroökonomische Aspekte der Synthese MHC-I-assoziiierter Peptide aus viralen Translationsprodukten. Es stellte sich heraus, dass insgesamt 500-3000 virale Transkriptionsprodukte durch die zellulären Proteasome degradiert werden müssen, um einen MHC-I-Peptid-Komplex zu generieren.

Man kann folglich davon ausgehen, dass endogene Prozessierung und Präsentation von Peptiden über MHC-I-Moleküle ein sehr ineffizientes Verfahren zu sein scheint.

Zur Beantwortung solcher Fragestellungen scheinen T-Zellen trotz der Tatsache, dass es gelingt, Immunantworten *in vitro* gegen bestimmte Antigene zu erzeugen und indirekt zu quantifizieren, ungeeignet. Es bedarf folglich weiterer Ansätze. Ein möglicher Ansatz soll in den folgenden Abschnitten vorgestellt werden.

6 MHC-Peptid-spezifische Antikörper

Lösliche Proteine mit einer den T-Zell-Rezeptoren ähnlichen Spezifität sind von grosser Bedeutung für Forschung, Diagnostik und Therapie.

MHC-Peptid-spezifische Antikörper stellen ein sehr wertvolles Instrument zur Beantwortung von Fragestellungen zur Antigenprozessierung und –präsentation dar. Aufgrund der strukturellen Homologie können sie ferner als Modell eines T-Zell-Rezeptors angesehen werden und in Folge dessen bei Fragestellungen zu Interaktionen des T-Zell-Rezeptors zur Anwendung kommen. Ein weiterer Aspekt besteht darin, dass MHC-Peptid-spezifische Antikörper gerade aufgrund der Homologie zum T-Zell-Rezeptor eine Möglichkeit darstellen, T-Zell-Antworten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu blockieren. Dies könnte therapeutische Optionen eröffnen bei allen Autoimmunerkrankungen, welche durch eine T-Zell-Reaktion gegen menschliches Gewebe gekennzeichnet sind. Als Beispiel hierfür wäre der Diabetes mellitus Typ 1 zu nennen, dessen Ursache in einer T-Zell-vermittelten Zerstörung der β -Zellen der Langerhans Inseln im Pankreas liegt. Eine weitere therapeutische Option bieten sol-

che MHC-Peptid-spezifischen Antikörper, welche neben der Fähigkeit, einen MHC-Peptid-Komplex *in vivo* zu erkennen, auch in der Lage sind, in der entsprechenden Zielzelle Apoptose zu induzieren.

Frühere Ansätze beschäftigten sich mit der Produktion löslicher rekombinanter T-Zell-Rezeptoren, was sich jedoch als problematisches Konzept herausstellte (Wulfing & Plückthun, 1994). Lösliche rekombinante T-Zell-Rezeptoren besitzen eine zu geringe Affinität, um unter den jeweiligen Versuchsbedingungen ausreichend lange an ihr Zielobjekt gebunden zu bleiben. Des Weiteren ist ihre rekombinante Expression und adäquate Faltung technisch sehr schwierig.

Daraufhin suchte man nach Alternativen und erkannte schließlich, dass MHC-Peptid-spezifische Antikörper eine sinnvolle Option darstellen.

6.1 *Definition*

Unter MHC-Peptid-spezifischen Antikörpern versteht man rekombinant hergestellte Immunglobuline oder Immunglobulinfragmente, welche ein Peptid spezifisch im Kontext eines MHC-Komplexes erkennen und binden. Sie interagieren weder wenn das Peptid noch der MHC-Komplex alleine vorliegen. Die Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes soll dabei in einer dem T-Zell-Rezeptor analogen Art und Weise erfolgen. Die Generierung von Antikörpern mit einer derartig hohen Spezifität gestaltete sich als methodisch herausfordernd.

6.2 *Generierung MHC-Peptid-spezifischer Antikörper*

In früheren Ansätzen zur Generierung rekombinanter monoklonaler MHC-Peptid-spezifischer Antikörper kam hauptsächlich das Prinzip der Immunisierung zum Einsatz. Es bestand darin, dass kleinen Nagetieren (Ratten oder Mäusen) in regelmäßigen Abständen antigenpräsentierende Zellen (APCs), welche den gewünschten MHC-Peptid-Komplex auf ihrer Oberfläche exprimierten, injiziert wurden. Als Folge sollte es im Sinne einer Immunisierung zu einer Antikörperproduktion gegen den je-

weiligen MHC-Peptid-Komplex kommen. Diejenigen Tiere, bei denen es zu einer Antikörperproduktion kam, wurden schließlich im Sinne einer Boosterung erneut immunisiert. Anschließend wurde den Tieren die Milz entfernt und die Splenozyten gemeinsam mit murinen Myelomzellen inkubiert. Daraus entstanden Hybridomzellen mit der Fähigkeit zur Produktion von Antikörpern vom IgG-Typ (Porgador et al., 1997; Zhong et al., 1997). Ein solches Vorgehen war jedoch zumeist nicht erfolgreich, was sich durch die wenigen hier zitierten Publikationen widerspiegelt.

Unter Verwendung einer Phagenbibliothek in Kombination mit dem bereits bekannten Verfahren der Immunisierung wurde schließlich ein weiterer Ansatz entwickelt: Dazu wurden in einem ersten Schritt Mäuse mit MHC-Peptid-Komplexen immunisiert und anschließend splenektomiert. Die aus den Milzen isolierte mRNA wurde in cDNA umgeschrieben, die cDNA-Fragmente amplifiziert, in einen Vektor eingefügt und letztlich die Fab-Fragmente als Fusionsprotein mit dem Protein pIII auf einem Bakteriophagen exprimiert. Diese Phagen wurden schließlich einer Selektion mittels Phage-Display-Technologie unterzogen (Andersen et al., 1996).

Die Nachteile dieser Verfahren bestehen einerseits in dem relativ hohen Zeitaufwand, der zur Generierung solcher Antikörper benötigt wird. Andererseits bergen jegliche Verfahren der Immunisierung den Nachteil, dass die generierten Antikörper muriner Herkunft sind, was einen Einsatz im Menschen von Beginn an ausschließt, da es mit hoher Sicherheit im Menschen zu einer Immunantwort gegen murine Antikörper kommen würde.

In dem von uns gewählten Vorgehen erfolgt die Generierung MHC-Peptid-spezifischer Antikörper aus nicht-immunisierten Phagen-Banken mittels Phage Display-Technologie.

7 *Prinzipien einer Phagenbibliothek*

Es ist das Ziel der Phage-Display-Technologie, aus einer großen rekombinanten Phagenbibliothek einen passenden Bindungspartner für einen bestimmten Liganden zu identifizieren und zu isolieren. Im Fall MHC-Peptid-spezifischer Antikörper stellt ein MHC-Peptid-Komplex den Liganden dar.

Das Prinzip einer Phagenbank besteht dabei darin, den *in vivo* im Immunsystem stattfindenden Selektionsprozess nachzuahmen (Marks et al., 1992) und schließlich dasjenige Antikörpermolekül, das sein Antigen am besten bindet, aus einem sehr großen Repertoire an Antikörpern zu isolieren.

Die Konstruktion einer solchen Bibliothek gestaltet sich folgendermaßen: In einem ersten Schritt werden B-Zellen aus Blut, Knochenmark oder Lymphknoten eines Spenders isoliert. Aus diesen wird schließlich RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der PCR alle Gene für leichte und schwere Ketten der Antikörperfragmente amplifiziert. Aus der Anzahl der verschiedenen Amplifikate resultiert die Diversität der entstehenden Bibliothek. Die Amplifikate werden in einen Bakteriophagenvektor ligiert. Das für ein Antikörperfragment kodierende Genfragment wird dabei unmittelbar vor das 5'-Ende des Gen *gIII* (kodiert für das Hüllprotein *pIII*) kloniert, so dass ein Fusionsgen bestehend aus dem Antikörperfragment und dem Hüllprotein *pIII* mit durchgehenden Leserahmen entsteht (Huse et al., 1989).

In einem nächsten Schritt macht man sich die Möglichkeit zu Nutze, das Fusionsgen als voll funktionelles Fusionsprotein zu exprimieren. Der C-terminale Teil repräsentiert dabei das Hüllprotein *pIII*, das, wenn in einer Wirtszelle exprimiert, in einem infektiösen Phagen in dessen Hülle integriert wird. Der N-terminale Teil des Fusionsproteins besteht dabei aus einem Antikörperfragment mit den Bindungseigenschaften des intakten vollständigen Antikörpers (Marks et al., 1992; Smith, 1985).

Die Bakteriophagen *fd*, *M13* und *f1* gehören einer Gruppe eng verwandter filamentöser Phagen an, welche bevorzugt männliche *E.coli* infizieren, ohne sie jedoch zu lysieren. Ihr Genom stellt eine etwa 6400 Basen umfassende zirkuläre Einzelstrang-DNA (ssDNA) dar und kodiert für zehn Gene. Die Hülle dieser Bakteriophagen besteht aus Tausenden von Produkten des Gens *VIII* (*pVIII*) sowie aus Produkten der Gene *III* (*pIII*), *VI*, *VII* und *IX*, wobei *pIII* etwa in fünffacher Ausführung vorkommt. Die Hauptaufgabe von *pVIII* besteht in der Umhüllung der DNA, die von *pIII* in der Infektion von Bakterien, indem es an den bakteriellen F-Pilus andockt.

Das Phagemid stellt ein chimäres Plasmid dar und enthält einerseits einen Replikationsursprung für Plasmide sowie andererseits auch einen Phagenreplikationsursprung (Breitling et al., 1991; Dübel et al., 1993; Hoogenboom et al., 1991). In einer Wirtszelle erfolgt die Replikation analog den doppelsträngigen Plasmiden. Werden Wirtszellen jedoch gleichzeitig mit einem Helferphagen infiziert, vermehren sich Phagemide wie Bakteriophagen, die Wirtszelle sezerniert schließlich infektiöse Virionen.

Diese enthalten die genetische Information aus Phagemid und Genom des Helferphagen und folglich auf ihrer Oberfläche einerseits das Fusionsprodukt pIII/Antikörperfragment sowie die im Helferphagengenom codierten nicht fusionierten pIII.

Es existieren Phagemide, welche in ihrem Genom zwischen Gen III und Antikörperfragment ein Amber-Stoppcodon besitzen (Hoogenboom et al., 1991), was die Produktion löslicher Antikörperfragmente erlaubt, welche dann weiterer Charakterisierung zugeführt werden können.

8 *Das Melan-A Protein*

Das maligne Melanom entsteht durch maligne Transformation der Melanozyten. Die Tumorerkrankung neigt dazu, früh hämatogen und lymphogen zu metastasieren, so dass die Erkrankung mit einer schlechten Prognose einhergeht. Hauptrisikofaktor für ein malignes Melanom ist die UV-Strahlung, insbesondere die exzessive Exposition gegenüber Sonnenlicht (Osterlind, 1993). So können wiederholte schwere Sonnenbrände, v.a. in Kindheit und Jugend, das Risiko für die Entstehung eines malignen Melanoms um ein Vielfaches erhöhen (Dodd et al., 2007). Weiter steigt das Risiko, im Laufe des Lebens an einem malignen Melanom zu erkranken, mit der Anzahl der Nävuszellnävi, v.a. der dysplastischen Nävi (Dodd et al., 2007; Rhodes et al., 1983; Rhodes et al., 1982).

Obgleich der Verlauf des malignen Melanoms sehr aggressiv ist, induziert es häufig eine Immunantwort des Patienten gegen den Tumor. Ein besseres Verständnis der zu Grunde liegenden Immunbiologie des Melanoms konnte mit der Identifikation von spezifischen Tumorantigenen erreicht werden. Unter Tumorantigenen versteht man Produkte solcher Gene, welche in Tumorzellen entweder überexprimiert bzw. ausschließlich exprimiert oder in mutierter Form vorkommen sowie zelllinienspezifische Differenzierungsantigene (Romero, 1996; Van den Eynde & van der Bruggen, 1997). Interessanterweise wurde ein Großteil solcher Tumorantigene im malignen Melanom identifiziert. Das Melan-A Protein stellt ein solches Tumorantigen dar, es wurde von den beiden Forschungsgruppen um *Coulie et. al* und *Kawakami et. al* unabhängig

voneinander erstmals beschrieben (Coulie et al., 1994; Kawakami et al., 1994a). Das Melan-A Gen hat eine Länge von 18 kb und besteht aus fünf Exons.

Das Melan-A Protein stellt ein linienspezifisches Differenzierungsantigen dar, welches sowohl in Melanomzellen als auch in normalen Melanozyten vorkommt. *Coulie et. al* führten eine Analyse des Expressionsmusters von Melan-A anhand von RNA aus Melanomzellen einerseits sowie RNA aus diverser anderer Tumorzellen andererseits durch und konnten zeigen, dass es zu keiner Expression in Tumorzellen anderen histologischen Ursprungs kommt, wohingegen 100% der analysierten Melanomproben eine Expression aufwiesen (Coulie et al., 1994).

In Melanomzellen wird das Melan-A Protein in der Regel überexprimiert. Melan-A-spezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) werden bei HLA-A*0201-positiven Patienten mit malignem Melanom sowohl unter den PBMC als auch unter den, den Tumor infiltrierenden Lymphozyten gefunden (Coulie et al., 1994; Kawakami et al., 1994b). Insgesamt konnten vier Peptide identifiziert werden, welche im Kontext von HLA-A*0201 präsentiert werden und den folgenden Aminosäuresequenzen im Melan-A-Protein entsprechen: 27-35, 27-36, 26-35, 32-40 (Kawakami et al., 1994b). Dabei wird das Melan-A₂₆₋₃₅ effizienter von CTL erkannt als das Melan-A₂₇₋₃₅. Melan-A₂₇₋₃₆ wird nur sehr schwach und Melan-A₃₂₋₄₀ nahezu nicht erkannt (Castelli et al., 1995; Romero et al., 1997; Valmori et al., 1998). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Peptide Melan-A₂₆₋₃₅ sowie Melan-A₂₇₋₃₅ immunodominant im Kontext von HLA-A*0201 sind und somit potentielle Kandidaten zur Entwicklung einer Melanom-spezifischen Vakzine darstellen. Nichtsdestoweniger ist bekannt, dass die Immunogenität dieser beiden Peptide *in vivo* sehr gering ist (Cormier et al., 1997; Jaeger et al., 1996). Als mögliche Erklärungen dieser schwachen Immunogenität wurden bisher einerseits die schwache Bindung der Peptide an das HLA-A*0201-Molekül (Sette et al., 1994) oder andererseits die geringe Stabilität des MHC-Peptid-Komplexes angesehen (van der Burg et al., 1996). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Bindung an das HLA-Molekül nach Konstruktion synthetischer Peptidvarianten erhöht werden kann.

8.1 *Melan-A Peptidvarianten*

Die beiden immunodominanten Melan-A Peptide Melan-A₂₆₋₃₅ sowie Melan-A₂₇₋₃₅ besitzen mit Glutaminsäure (E) an Position 1 eine negativ geladene Aminosäure, was sich negativ auf die Stabilität des MHC-Peptid-Komplexes auswirkt. Weiter fehlt beiden Peptiden eine für die Bindung an das HLA-A*0201-Molekül wichtige dominante Anker-Seitenkette an Position 2, wie es z.B. bei Methionin oder Leucin der Fall ist. Ihre hydrophoben Seitenketten bilden Wechselwirkungen mit der Bindungsgrube des HLA-A*0201 Komplexes aus. Es liegt daher nahe, synthetische Peptidvarianten zu konstruieren und ihre Bindungseigenschaften im Vergleich mit denen der natürlich vorkommenden Peptide zu verbessern.

Die Konstruktion solcher Peptidvarianten wurde bereits erfolgreich im Fall des Peptids gp100 durchgeführt (Bakker et al., 1997; Parkhurst et al., 1996). Im Fall des Melan-A bestanden mehrere Möglichkeiten der Aminosäuresubstitution: Einerseits konnte eine Substitution von Glutaminsäure (E) an Position 1 durch Phenylalanin (F) oder Tyrosin (Y) sowie andererseits eine Substitution von Alanin (A) an Position 2 durch Leucin (L) oder Methionin (M) erfolgen. Es hat sich dabei das an Position 2 durch Leucin substituierte (A27L substituiert) Melan-A₂₆₋₃₅, ELAGIGILTV, als dasjenige Peptid herausgestellt, welches sowohl *in vivo* als auch *in vitro* am effizientesten zytotoxische T-Zellen zu aktivieren vermag (Men et al., 1999; Valmori et al., 1998; Valmori et al., 2000).

Experimentelle Daten lassen vermuten, dass sowohl die endogene Prozessierung des natürlich vorkommenden Melan-A Proteins als auch dessen A27L substituierte Variante letztlich in einer ineffektiven Präsentation der Peptide EAAGIGILTV bzw. ELAGIGILTV im Kontext des HLA-A*0201 Komplexes resultiert. Wird Melan-A in Form des Wildtypes exprimiert, so akkumuliert das Melan-A Protein, welches eine Transmembrandomäne in der trans-Golgi-Region enthält. Erfolgt dagegen eine Inversion der Membrantopologie durch Änderung der Aminosäuresequenz N-terminal des Epitops Melan-A₂₆₋₃₅, so kommt es zu einer Retention des Proteins im ER. Durch diese Retention kommt es in der Folge zu einer weitaus stärkeren Reaktivität Melan-A₂₆₋₃₅ spezifischer zytotoxischer T-Zellen verglichen mit der gegen den Wildtyp (Rimoldi et al., 2001).

Die Expression solcher Klone, welche für ein N-terminal verlängertes Epitop Melan-A₂₆₋₃₅ codieren, führt zu einer schwächeren T-Zell-Reaktivität verglichen mit der

Reaktivität nach Expression von Vektoren, welche für die fertigen antigenen Peptide codieren (Chapatte et al., 2004). Ferner werden weder das natürliche Peptid Melan-A₂₆₋₃₅ noch die A27L- mutierte Variante effizient durch das Immunoproteasom prozessiert (Morel et al., 2000).

Die überwiegende Anzahl an Daten zur Prozessierung und Präsentation von Melan-A wurden bisher gewonnen, indem man die Reaktivität spezifischer zytotoxischer T-Zellen gegen APC quantifiziert hat. Es existieren jedoch bislang keine Daten zur exakten Quantifizierung des MHC-I-Peptid-Komplexes auf der Zelloberfläche. Zytotoxische T-Zellen sind durchaus in der Lage, auch im Falle einer kleinen Anzahl an MHC-Peptid-Komplexen auf der Zelloberfläche eine schwache, jedoch messbare Immunantwort zu erzeugen (Irvine et al., 2002; Purbhoo et al., 2004; Sykulev et al., 1996), jedoch eignen sie sich nicht zur exakten Quantifizierung ihrer Zielstrukturen.

9 *Ziel der Arbeit*

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen zur Prozessierung und Präsentation von Melan-A₂₆₋₃₅ im Kontext des MHC-I-Komplexes mit MHC-Peptid-spezifischen Antikörpern sowie die Evaluation der Bindungskinetiken der selektierten Antikörper.

Hierzu befasst sich der erste Teil der vorliegenden Arbeit mit der Identifizierung, Generierung und Charakterisierung solcher MHC-Peptid-spezifischer Fab-Antikörper, welche das im Kontext des HLA-A*0201-Komplex präsentierte Melan-A₂₆₋₃₅ Peptid EAAGIGILTV erkennen.

Diese Fab-Antikörper finden ihre Anwendung in grundlegenden Untersuchungen zur Antigenprozessierung. Es sollte die Effizienz der Antigenprozessierung am Beispiel des Melanom-spezifischen Antigens Melan-A untersucht werden. Durch die hohe Strukturhomologie von Fab-Antikörpern mit T-Zell-Rezeptoren wurden am Modell der Fab-Antikörper bindungskinetische Analysen ihrer Interaktion mit den verschiedenen Peptidvarianten durchgeführt. Hierzu sollte erarbeitet werden, in wieweit die unterschiedliche Immunogenität der Peptidvarianten einen systematischen Einfluss auf die Bindungskinetik hat.

III Material und Methoden

1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
1 M Salzsäure	Merck
1 M Schwefelsäure	Merck
Acrylamid Mix	Roth
Agar, granulated	Difco™
Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Ampicillin	Ratio
β-Mercaptoethanol	Merck
Biotin	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck
Bromphenolblau	Merck
Chloramphenicol	Roche
Coomassie Brillinat Blue G250	BIO-RAD
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma
DNA-Primer	MWG AG Biotech
Dynabeads® M-280 Streptavidin	Dynal Biotech
1-Ethyl-3(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid-Hydrochlorid (EDC)	Amine Coupling Kit, Biacore AB
Eisessig	Merck
Ethanol	Merck

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Ethanolaminhydrochlorid	Amine Coupling Kit, Biacore AB
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA
GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder	Fermentas
GFP (rekombinant)	Zur Verfügung gestellt von G. Schlenstedt, Biochemie, Uniklinik des Saarlandes, Homburg
Glycerol	Merck
Glycinn	Merck
HBS-EP Puffer (HEPES-Puffer)	Biacore, AB
Imidazol (zur Synthese)	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kanamycin	Sigma
Laurylsulfat (SDS)	Merck
Methanol	Merck
Natriumhydrogenphosphat Monohydrat	Roth
Natriumhydroxid	Merck
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Amine Coupling Kit, Biacore AB
Orange G	Merck
P1 Puffer	Fermentas
Penicillin	Roche

<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</i>	<i>Hersteller</i>
Ponceau S pure	Serva
Proteinase Inhibitor Cocktail tablets Complete TM EDTA-free	Roche Diagnostics
QuantiBRITE TM PE (Phycoerythrin Fluorescence Quantitation Kit)	Becton, Dickinson and Company
Restriktionsenzyme BstN-1, NotI und EcoRI	Fermentas
Restriktionspuffer NEB2 und NEB3	Fermentas
RPMI 1640 Kulturmedium	PAA
Sensor Chip CM5, Research Grade	Biacore AB
Streptavidin	Gibco
Streptomycin	Roche
Sucrose	Sigma
Synthetische DNA, Primer	MWG AG Biotech
T4 DNA-Ligase	Roche Diagnostics
Talon TM Metal Affinity Resin	Clontech Laboratories, Inc.
Taq-Polymerase	Fermentas
Taq-Reaktionspuffer	Fermentas
TEMED	Roth
TMP Microwell Peroxidase Substrat System	Kirkegaard & Perry Lab.
Triethylamin (TEA)	Merck
Tris	Roth
Tris Hydrochlorid	Roth
Tris Hydroxymethylaminomethan (Tris Base)	Merck
Tryptone	Becton, Dickinson and Company Bacto TM

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Tween 20	Caesar und Lorenz GmbH
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (ECL)	Perkin Elmer LAS, Inc.
Yeast-Extract	Becton, Dickinson and Company Bacto™

2 *Peptide, Antikörper und Färbereagenzien*

Peptid	Aminosäuresequenz
Melan-A ₂₆₋₃₅	EAAGIGILTV
Melan-A ₂₆₋₃₅ A27L	ELAGIGILTV
Melan-A ₂₇₋₃₅	AAGIGILTV
Melan-A ₂₇₋₃₅ A27L	LAGIGILTV
Melan-A ₂₇₋₃₅ A28L	ALGIGILTV
SSX2 ₁₀₃₋₁₁₁	RLQGISPKE
SSX2 ₄₁₋₄₉	KASEKIFYV
G250 ₂₅₄₋₂₆₂ HLS	HLSTAFARV
G250 ₂₇₁₋₂₇₉ GLA	GLAVLAAFL
G250 ₄₂₁₋₄₂₉ GLL	GLLFAVTSV
CMV ₄₉₅₋₅₀₃ pp65	NLVPMVATV
NY-Eso1 ₁₅₇₋₁₆₅	SLLMWITQC

Antikörper und Färbereagenzien	Hersteller
Anti-c-myc, Klon 9E10	Onkologisches Labor, Uniklinik des Saarlandes, Homburg
Anti-GFP (Klon 7.1 und 13.1)	Roche
Anti-HLA-A2, Klon BB7.2	Onkologisches Labor, Uniklinik des Saarlandes, Homburg
Anti-HLA-A2, Klon Tü 155	Zur Verfügung gestellt von Prof. Andreas Ziegler, Berlin
Anti-M13	GE Healthcare
Anti-Streptavidin-Phage, Klon F2 (coating control)	Onkologisches Labor, Uniklinik des Saarlandes, Homburg
Anti-Ubiquitin	Sigma
Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat anti-Human IgG	Dako Cytomotation
Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat anti-Mouse IgG (H+L) [anti-Maus-Biotin]	Dako Cytomotation
Fragment Goat anti-Human IgG, F(ab') ₂ Fragment Specific	Dako Cytomotation
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate	BIO-RAD
Helfer-Phage M13-K07	GE Healthcare
HRP-conjugated Streptavidin	Sigma Aldrich
Monoclonal Anti-Green Fluorescent Protein (GFP) antibody produced in mouse	Sigma Aldrich
Poyclonal Rabbit anti-mouse Immunglobulins/HRP	Dako Cytomotation
Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Cojugate	BIO-RAD
Rabbit Anti-Ubiquitin	Sigma Aldrich
R-Phycoerythrin-conjugated Streptavidin [Streptavidin-PE]	Dako Cytomotation
W6/32, anti-human HLA-ABC Klasse I Schwereketten/β2m-Antikörper	Dako Cytomotation

3 *Puffer und Lösungen*

1 M Imidazol:

- 34 g Imidazol
- mit PBS pH8 auf 1 Liter auffüllen
- für Eluation der Fab-Antikörper mit PBS pH 8 auf 100 mM verdünnen

1 x PBS:

- 1,14 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,34 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 8,78 g NaCl

1 x TBS:

- 1,4 g Tris Base
- 6,05 g Tris Hydrochlorid
- 8,78 g NaCl
- mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 1 Liter auffüllen (pH 7,6)

10 x Lämmli-Laufpuffer:

- 144 g Glycin
- 30,34 g TrisBase
- 10 g SDS
- auf 1 Liter mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auffüllen, für SDS-Gel 1:10 verdünnen

10 x Transferpuffer für Westernblot:

- 30 g Tris Base
- 144 g Glycin
- mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 1 Liter auffüllen
- für Westernblot: 1x Puffer mit 20% Methanol verwenden (immer frisch ansetzen)

12% SDS-Polyacrylamid-Gel (Ansatz für 10 ml):

- 3,3 ml H₂O_{dest}
- 4 ml 30% Acrylamid-Mix
- 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
- 0,1 ml 10% SDS
- 0,1 ml 10% APS
- 0,004 ml TEMED

2 x TY-Agar:

- 16g Trypton
- 10 g Yeast-Extrakt
- 5 g NaCl
- 15 g Agar
- auf 1 Liter mit H₂O_{dest} auffüllen und autoklavieren
- nach Abkühlen 2% Glucose sowie 100 µg/ml Ampicillin zugeben und in Petri-schalen gießen

2 x TY-Medium:

- 16 g Trypton
- 10 g Yeast-Extrakt
- 5 g NaCl
- auf 1 Liter mit H₂O_{dest} auffüllen und autoklavieren
- für 2 x TY-AG: nach Autoklavieren in abgekühltes Medium 2% Glucose sowie 100 µg/ml Ampicillin zugeben
- für 2 x TY-AK: nach Autoklavieren in abgekühltes Medium 100 µg/ml Ampicillin sowie 25 µg/ml Kanamycin zugeben
- für Produktion biotinylierter Fab-Antikörper in 2 x TY-AG zusätzlich noch 100µg/ml Chloramphenicol zugeben

3%iges Agarose-Gel:

- 3 g Agarose
- 100 ml 1 x TAE
- Suspension aufkochen

- nach Abkühlen auf ca. 60° C Zugabe von 100 µl Ethidiumbromid (Konzentration 0,5 µg/ml)

5 x SDS-Laufpuffer:

- 0,6 ml 1 M Tris pH 6,8
- 3 ml 85% Glycerol
- 2 ml 10% SDS
- 10 mg Bromphenolblau
- 4,4 ml H₂O_{dest}
- für reduzierenden Laufpuffer: Zugabe von 5% β-Mercaptoethanol

50 x TAE-Stammlösung:

- 242 g TrisBase
- 57,1 ml Eisessig
- 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
- auf 1 Liter mit H₂O_{dest} auffüllen und autoklavieren

Coomassie-Entfärber:

- 40% Ethanol
- 10% Eisessig

Coomassie-Färbelösung:

- 1 g Coomassie Brilliant Blue R250
- 450 ml Methanol
- 100 ml Essigsäure
- 450 ml H₂O_{dest}

Ethidiumbromid:

- Stammlösung mit 10 mg/ml verdünnen mit H₂O_{dest} auf 0,5 mg/ml
- für Agarose-Gele 1:1000 verdünnen

Ladepuffer für Agarosegele:

- 0,25 % Bromphenolblau
- 0,25 % Xylenxyanol FF
- 0,25 % Orange G
- 1 mM EDTA
- 40 % Sucrose

LB-Medium:

- 10 g Trypton
- 5 g Yeast-Extrakt
- 10 g NaCl
- auf 1 Liter mit H₂O_{dest} auffüllen und autoklavieren

PEG/NaCl:

- 20% Polyethylenglycol 6000 (PEG)
- 2,5 M NaCl

Puffer zum Strippen einer Proteinmembran:

- 0,2 M Glycin pH 2,2
- 0,1% SDS
- 1% Tween 20

SOC-Medium:

- 2% Trypton
- 1% Yeast-Extract
- 0,1% NaCl
- 250 mM KCl
- mit NaOH auf pH 7,0 einstellen und anschließend autoklavieren
- Zugabe von 10 mM MgCl₂ (steril) und 20 mM Glucose (steril)

Stack-Gel für Gelelektrophorese (Ansatz für 2 ml) :

- 1,4 ml H₂O_{dest}
- 0,33 ml 30% Acrylamid-Mix
- 0,25 ml 1 M Tris (pH 6,8)
- 0,02 ml 10% SDS
- 0,02 ml 10% APS
- 0,002 ml TEMED

TENS-Puffer:

- 10 mM Tris
- 0,1 M NaOH
- 6,5% SDS
- H₂O_{dest}

TS-Puffer:

- 12,115 g 0,2 M Tris
- 85,6 g Sucrose
- mit H₂O_{dest} auf 500 ml auffüllen, auf pH 8,0 einstellen

4 Zellkultur

Die für die Durchflusszytometrie verwendeten Zelllinien wurden bei 37° C und einem Kohlendioxidanteil von 5 % in RPMI 1640-Kulturmedium mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) sowie 1 % Glutamin kultiviert. Zur Vermeidung einer bakteriellen Kontamination wurden Penicillin und Streptomycin in einer Endkonzentration von 50 U/ml zugesetzt.

5 *Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren*

Bei der Agarosegelelektrophorese wandern größenabhängig negativ geladene Nukleinsäurefragmente unterschiedlich weit im elektrischen Feld.

Diese Fragmente können mittels Ethidiumbromid (auch als Ethidium oder Homidium bekannt) visualisiert werden. Ethidiumbromid bindet an Nukleinsäuren durch Interkalation zwischen den Basen der DNA bzw. RNA (drei Moleküle je zehn Basen) und verändert dabei sein Absorptionsspektrum bei nahezu unverändertem Emissionsspektrum bei 590 nm. Dadurch wird die Fluoreszenz bei Anregung mit ultraviolettem Licht (302 nm) um den Faktor 50-100 erhöht. Es leuchten somit auf dem UV-Kasten die Stellen im Agarosegel, an denen sich Nukleinsäuren oder –fragmente befinden, hell auf, während das restliche Gel dunkel erscheint. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorliegenden Nukleinsäurekonzentration sowie zu deren Länge. Bei Arbeiten mit Ethidiumbromid gilt es jedoch zu beachten, dass diese Substanz 2005 von der Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe als krebverdächtiger Arbeitsstoff der Kanzerogenitäts-Kategorie 3B zugeordnet wurde. Somit sollten bei jedem Umgang entsprechende Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Agarose stellt die Hauptkomponente der Gele dar und kommt in vivo in Rotalgen vor. Es handelt sich dabei um ein Polysaccharid aus D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose, welche glykosidisch miteinander verbunden sind. Agarose besitzt eine große Tendenz zur Gelbildung und ist somit für die Gelierfähigkeit der Gele verantwortlich. Die Konzentration der Agarose in der Pufferlösung richtet sich nach der Größe der mit der Gelelektrophorese aufzutrennenden Teilchen. Es gilt dabei allgemein: Je kleiner die aufzutrennenden Teilchen, desto höher sollte die Konzentration an Agarose gewählt werden, um eine optimale Auftrennung zu erzielen; für große Teilchen gilt analog das Gegenteil.

Für DNA-Gele wurde ein 3%iges Agarosegel nach Abkühlung und Zugabe des Ethidiumbromids in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Zur Elektrophorese wurden die einzelnen Taschen des Gels mit jeweils 10-15 µl DNA-Proben, welche zuvor mit 5 µl Ladepuffer verse-

hen wurden, beladen und die Nukleinsäuren bei 40-100 V in der Elektrophoresekammer entsprechen ihrer Größe aufgetrennt.

6 *Die Phage-Display Technologie*

6.1 *Phagemidbank*

Die in dieser Arbeit verwendete Phagemidbank exprimiert ein sehr großes, naives Fab-Repertoire mit einer Diversität von $4,2 \times 10^{10}$ verschiedenen Fab-Antikörpern.

Die große Diversität erlaubt die Selektion von Antikörpern mit Spezifität für praktisch jedes Antigen (de Haard et al., 1999). Das komplette Fab-Repertoire dieser Bank wurde uns von DYAX sa, Liege, Belgien zur Verfügung gestellt.

6.2 *Selektion von Phagen-Antikörpern auf biotinylierte MHC-Komplexe*

6.2.1 *MHC-Peptid-Komplexe*

MHC-Peptid-Komplexe stellen die Antigene der zu selektionierenden Antikörper dar. Sie wurden als biotinylierte Monomere verwendet und freundlicherweise von Prof. Immanuel Luescher, Lausanne, zur Verfügung gestellt.

6.2.2 *Prinzip der Selektion*

Um das Repertoire der Phagen-Bank in seiner Gesamtheit zur Verfügung zu haben, wurden für die Selektion Phagen in zehn- bis hundertfacher Menge der Diversität der Phagen-Bank eingesetzt. Das Volumen dieser Lösung betrug 500 µl. Zur Quantifizierung der eingesetzten Menge wurden 10 µl der Phagen-Lösung entnommen, eine Verdünnungsreihe pipettiert (meist in den Verdünnungsstufen 10^{-8} bis 10^{-11}) und der

sogenannte Input-Titer anhand *colony-forming units (cfu)* nach Infektion von *E.coli* (TG1) bestimmt. Die Phagen-Lösung wurde in einem ersten Schritt im Verhältnis 1:1 mit 4% Milchpulver/PBS (4%M/PBS) für 60 Minuten in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur (in der Folge als RT bezeichnet) auf einem Laborrad vorgeblockt. Dieser Schritt diente dazu, unspezifische Interaktionen infektiöser Phagen mit der Plastikoberfläche der Eppendorf-Reaktionsgefäße und dem Antigen zu inhibieren. Gleichzeitig wurden Streptavidin-Dynabeads vorbereitet. Diese bestehen aus einem supermagnetischen Polystyrol-Kern, an den kovalent Streptavidin gebunden ist (s. Dynal Biotech Produktmonographie). Dabei wurden für die erste Selektionsrunde 600 µl Streptavidin-Dynabeads verwendet, für die zweite Runde 200 µl und für die dritte Runde noch 100 µl. Die Streptavidin-Dynabeads wurden mit 1 ml 4%M/PBS für 1-2 Stunden bei RT ebenfalls auf dem Rad vorgeblockt.

Um Streptavidin-Binder aus dem Phagen-Repertoire zu entfernen, wurde zu Beginn der zweiten Runde die Phagen-Lösung 30 Minuten mit 100 µl Streptavidin-Dynabeads vorinkubiert, welche anschließend in einem magnetischen Feld (Magnet Dynal MPC[®]-S) wieder entfernt wurden; damit sollte erreicht werden, dass sich in der Phagenlösung keine Streptavidin-Binder mehr befinden. Der verbleibende Überstand wurde weiter verwendet.

Nach den 60 Minuten Vorinkubation der Phagen mit 4%M/PBS wurde das biotinylierte Antigen (hier ein MHC-Peptid-Komplex) direkt in das Phagen/4%M/PBS-Gemisch pipettiert und für 60 Minuten bei RT auf dem Rad inkubiert. Die Menge an Antigen wurde dabei analog zu den Streptavidin-Dynabeads von Runde zu Runde reduziert. Dies führte zur selektiven Anreicherung von Phagen, die eine hohe Affinität gegenüber den Zielmolekülen aufweisen. In der ersten Runde wurden dabei 300 nmol Antigen eingesetzt, in der zweiten Runde 100 nmol und in der dritten Runde noch 20 nmol.

Nach der Vorinkubation der Streptavidin-Dynabeads in 4%M/PBS wurden diese mit Hilfe eines Magnetes (Dynal MPC[®]-S, Magnetständer von Dynal) an den Rand des Eppendorf-Reaktionsgefäßes gezogen und die überschüssige Lösung, welche nun keine Beads mehr enthielt, abpipettiert. Die Streptavidin-Dynabeads wurden in dem Phagen-Antigen-Mix resuspendiert und 15 Minuten bei RT auf dem Rad inkubiert. Dabei wurde der Phagen-Antigen-Komplex an das freie Streptavidin der Dynabeads gebunden. Um nicht bindende Phagen zu entfernen, wurden die Phagen-Antigen-Dynabeads-Komplexe zunächst dreimal mit 2%M/PBS/0,1% Tween 20 gewaschen.

Nach jedem Waschschrift wurden die Dynabeads mit Hilfe des Magneten an den Rand des Reaktionsgefäßes gezogen und die Waschlösung vorsichtig abpipettiert. Es folgten anschließend in analoger Weise jeweils drei Waschschriffe mit PBS/0,1% Tween 20 sowie mit reinem PBS, wobei die Suspension jeweils nach dem dritten Waschschrift in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt wurde. Nach dem letzten Waschen wurden die Phagen-Antigen-Dynabeads-Komplexe im 1 ml PBS resuspendiert und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Nun wurden die Phagen aus ihrer Bindung im Phagen-Antigen-Dynabeads-Komplex eluiert, indem die Beads in 1 ml 100 mM Triethylamin pH 12 für 5-10 Minuten bei RT resuspendiert wurden. Das alkalische Milieu trennte dabei die Bindung der Phagen zu dem biotinylierten MHC-Peptid-Komplex. Die Suspension wurde dann erneut in das magnetische Feld gegeben, wo dann durch Abpipettieren des Überstandes die Streptavidin-Dynabeads von den Phagen getrennt werden konnten. Die so eluierten Phagen wurden unmittelbar danach mit 500 µl 1M Tris-HCL pH 7,4 neutralisiert. Aus dieser Phagensuspension wurden dann, bevor sie für weitere Selektionsrunden verwendet wurden, 10 µl zur Bestimmung des Output-Titers entnommen.

6.2.3 *Bestimmung des Phagentiters und Phagenamplifikation*

Männliche *E.coli* exprimieren unter bestimmten Bedingungen Sexual- oder Fertilitätspili, kurz als F-Pili bezeichnet. Diese dienen der Konjugation (horizontaler Gentransfer). Zu diesem *E.coli* gehört der *E.coli*-Stamm TG1. Nachdem der Phage sich mit Hilfe des Hüllproteins p3 an den F-Pilus angelagert hat, kommt es zur Internalisierung des Phagemids. Über die internalisierte DNA wird dem Bakterium dann eine Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin vermittelt.

Die benötigten TG1-Bakterien wurden in 25 ml 2 x TY-Medium (enthält kein Antibiotikum, da noch keine Resistenz vorhanden ist) aus einem Glycerol-Stock angeimpft und für mindestens 12 Stunden bei 30° C, 270 U/min wachsen gelassen. Aus dieser Kultur konnten dann bei Bedarf 50 ml 2 x TY 1:100 angeimpft werden, die neue Kultur wurde schließlich bei 37° C, 170 U/min inkubiert, bis durch das Bakterienwach-

stum eine Optische Dichte bei 600 nm (in der Folge als OD₆₀₀ bezeichnet) von ca. 0,5 erreicht ist.

6.2.3.1 *Bestimmung des Phagentiters (Input und Output)*

Die Bestimmung des Phagentiters erfolgte vor und nach jeder Selektionsrunde und wurde entsprechend als „Input“ bzw. „Output“ bezeichnet.

Zur Input-Bestimmung wurden aus der Phagen/4%MPBS-Suspension (bestehend aus den Phagen der vorhergehenden Runde) vor Zugabe des Antigens 10 µl entnommen. Daraus wurden dann Verdünnungsstufen in 2 x TY erstellt, in der Regel von 10⁻⁸ bis 10⁻¹¹. Die jeweiligen Verdünnungsstufen wurden anschließend 1:1 mit einer TG1-Bakterienkultur gemischt und für 30 Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Dabei galt es darauf zu achten, dass die Bakterienkultur ein OD₆₀₀ von 0,5 aufweist. Während der Inkubation kam es dann zur Infektion der TG1-Bakterien durch die Phagen. Es wurde schließlich von jeder Verdünnungsstufe 1/10 auf 2 x TY-AG Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

Die Bestimmung des Output-Titers erfolgte analog zur Input-Bestimmung. Ausgangsprodukt waren in diesem Fall die eluierten Phagen am Ende der Selektionsrunde. In der Regel wurden Verdünnungsstufen von 10⁻⁴ bis 10⁻⁶ erstellt und nach Inkubation mit TG1 ebenso auf 2 x TY-AG Platten ausgestrichen.

Zur Bestimmung des Phagentiters (Output) wurde eine Verdünnung der bei der Selektion eluierten Phagen von 10 fach bis 100 fach in 2xTYAG-Medium hergestellt.

Am folgenden Tag erfolgte die Bestimmung der In- und Output-Titer, welche dem folgenden Prinzip folgt: Man zählt die Kolonien auf den einzelnen Platten (optimal wäre eine Verdünnungsstufe, bei der man nicht zu viele und auch nicht zu wenige Kolonien findet) und errechnet anschließend die Titer gemäß folgender Formel:

$$\text{Phagentiter [Anzahl an Phagen/ml]} = (\text{Anzahl an Kolonien}) \times (1/\text{Verdünnungsstufe}) \times (1/\text{ausplattierte Menge}) \times 2$$

6.2.3.2 *Phagenamplifikation*

Das für die jeweils nächste Runde benötigte Phagenrepertoire wurde gewonnen, indem 5 ml der exponentiell wachsenden TG1-Bakterienkultur mit 1 ml der eluierten Phagen, gelöst in 4 ml 2xTY-AG-Medium, vermischt wurden. Diese 10 ml Lösung wurde dann für 30 Minuten bei 37° C im Wasserbad zur Infektion inkubiert. Um besser ausplattieren zu können, wurde das Volumen verringert, indem man die Zellen für 10 Minuten bei 3000 g zentrifugierte und das Zellepellet in 2 ml 2xTY-AG-Medium resuspendierte. Diese Zellsuspension wurde dann in der ersten Runde der Selektion auf zwei 16 cm² großen 2xTY-AG-Platten, in den Runden zwei und drei jeweils nur auf einer Platte, ausgestrichen. In der ersten Runde wurde deshalb auf zwei Platten ausplattiert, um die maximale Komplexität der Phagen zu erhalten.

Die Platten wurden dann über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert; am nächsten Tag wurde der Bakterienrasen mit ca. 5 ml 2xTY-AG-Medium abgelöst. Danach wurde die Lösung aufkonzentriert, indem man sie für 10 Minuten bei 3000 g zentrifugierte und das entstandene Zellpellet in 1-2 ml 2xTYAG resuspendierte. Davon wurden anschließend Glycerol-Stocks erstellt: Man überführt dazu das Konzentrat in ein Nunc®-Cryotube und gibt steriles Glycerol bis zu einer 15%igen Endkonzentration hinzu. Diesen Stock friert man sofort bei -70° C ein, um möglichst wenig Bakterien durch das Glycerol abzutöten.

Die so entstandenen Stocks dienten dann wiederum der Gewinnung des Phagenrepertoires für die jeweils anschließende Runde. Diese erstreckte sich über zwei Tage: Zu Beginn wurden aus dem Glycerol-Stock 50 ml 2xTYAG angeimpft und anschließend die Kultur bei 37° C, 170 U/min bis zu einem OD₆₀₀ von ca. 0,5 inkubiert. Daraus wurden dann 5 ml in ein steriles Reaktionsröhrchen entnommen und 1,5 µl M13-K07-Helferphagen aus einem Stock mit einer Phagenkonzentration von ca. $2 \cdot 10^{13}$ pfu/ml dazugegeben; diese Suspension wurde dann für 30 Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubiert, so dass eine Infektion durch den Helferphagen erfolgen konnte. Danach wurde die Suspension für 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert, das entstandene Zellpellet in 25 ml 2xTY-AK resuspendiert und die Suspension in einen neuen 300 ml-Glaskolben überführt. Über Nacht erfolgte dann bei 30° C und 170 U/min die Phagenproduktion. Am nächsten Tag konnte dann die Reinigung der produzierten Phagen erfolgen.

Dazu wurde die Suspension in ein steriles 50 ml-Reaktionsröhrchen überführt und für 20 Minuten bei 3000 g zentrifugiert, so dass die Bakterien pelletiert wurden. Zum Überstand wurde 1/5 des Volumens PEG/NaCl zugegeben und das Gemisch für mindestens 1 Stunde auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wurden die Phagen pelletiert, indem man sie für 15 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt, das Phagenpellet in 1 ml sterilem PBS resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nun wurden noch verbleibende Bakterien durch eine kurze Zentrifugation von 2 Minuten bei 13000 g entfernt. Der resultierende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl PEG/NaCl gemischt und schließlich 10-20 Minuten auf Eis inkubiert. Die nun gereinigten Phagen wurden schließlich ein letztes Mal für 5 Minuten bei 13000 g zentrifugiert und das Pellet in 500 µl PBS resuspendiert.

Die Phagen konnten nun direkt für Versuchszwecke eingesetzt werden oder mit 15 % Glycerol bei -70° C eingefroren werden.

6.2.4 *Produktion von Phagen in einer 96-Well-Microtiter-Platte*

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, eine große Anzahl von Phagen aus den in der Selektion gewonnenen Klonen zu produzieren. Das Prinzip der Phagenproduktion ist hierbei dasselbe wie in Kapitel 6.2.3.2 beschrieben.

Um mit der Produktion starten zu können, wurden zuerst Kolonien von den nach der Selektion erhaltenen Output-Platten gepickt und diese in 100 µl 2xTY-AG-Medium in einer 96-Well-Microtiter-Rundbodenplatte inokuliert. Diese wurden dann bei 30° C und 255 U/min über Nacht im Brutschrank inkubiert. Wichtig war hierbei, zur Überprüfung der Phagenproduktion Kontrollen mit zu inokulieren. Hierzu wurde der Phage des Klons F2 mit inokuliert wurde; mit dessen Hilfe konnte man auch das korrekte Coating der ELISA-Platten kontrollieren. Außerdem wurden mehrere Wells auf der Platte nicht mit Bakterien inokuliert, um eine eventuelle Kreuz-Kontamination während der Phagenproduktion besser ausschließen zu können.

Am nächsten Tag wurden von der so erhaltenen Platte in eine neue 96-Well-Rundbodenplatte-Platte (Costar®), die pro Well 120 µl 2xTY-AG-Medium enthielt,

jeweils 2 µl inokuliert. Das Bakterienwachstum konnte dann bei 37° C und 170 U/min bis zu einem OD₆₀₀ von ca. 0,5 erfolgen. In die originale Master-Platte vom Vortag wurden pro Well 35 µl steriles Glycerol 60% pipettiert und diese direkt bei -70° C eingefroren. Diese Master-Platte diente für alle weiteren Versuche als Repertoire zur Gewinnung von Phagen und Fab-Antikörpern.

Nach Erreichen der Optischen Dichte von ca. 0,5 wurde in jedes Well 40 µl 2xTY-AG-Medium pipettiert, welches ca. $2 \cdot 10^9$ Phagen/ml Helferphage M13K07 enthielt. Hierbei sollte das Verhältnis Phage zu Bakterien bei ungefähr 20:1 liegen. Nach 30 Minuten bei 37° C im Brutschrank wurde die Platte für 10 Minuten bei 450 g zentrifugiert. Danach war es ganz wichtig, den Überstand komplett abzupipettieren, da jede Anwesenheit von Glucose dazu führt, dass die Bakterien diese zuerst verbrauchen und erst danach mit der Phagenproduktion beginnen. Dadurch käme es zu einer ineffektiven Phagenproduktion mit einer geringeren Ausbeute.

Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 120 µl 2xTY-AK resuspendiert und anschließend für 14-18 Stunden bei 30° C und 255 U/min inkubiert.

Am dritten Tag wurde schließlich die Bakterien-Phagen-Suspension für 10 Minuten bei 450 g zentrifugiert und der Überstand, welcher die produzierten Phagen enthält, im ELISA eingesetzt.

6.2.5 ELISA zur Detektion von Phagen-Antikörper-Fragmenten

Die Spezifität der einzelnen Phagen-Klone aus den Selektionsrunden wird mittels ELISA gezeigt. Hierbei wurden die benötigten MHC-Peptid-Komplexe folgendermaßen auf die Nunc®-Maxisorb-Platte aufgebracht (Chames et al., 2000):

Im ersten Schritt wurde biotinyliertes BSA (bBSA) in der Verdünnung 1:1000 in PBS für eine Stunde bei 37° C auf die Platte gecoatet. Im zweiten Schritt wurde darauf Streptavidin in der Verdünnung 1:100 für eine Stunde bei RT aufgebracht, bevor dann in einem dritten Schritt die biotinylierten MHC-Peptid-Komplexe über Nacht bei 4° C an das Streptavidin gekoppelt wurden. Zwischen den einzelnen Coating-Schritten wurde jeweils dreimal mit PBS gewaschen.

Das Aufbringen des biotinylierten BSA-Streptavidin-Spacers bewirkt, dass die MHC-Peptid-Komplexe (im Verlauf als pMHC bezeichnet) ihre korrekte Faltung behalten. Bindet man die pMHC direkt an das Plastik der 96-Well-Platte, kann es vorkommen, dass sich die Faltung der Komplexe verzerrt und somit keine Aussage bezüglich der Spezifität der Phagen mehr ermöglicht wird.

Um die korrekte Faltung und Stabilität der Komplexe während des Bindungsassays kontrollieren zu können, erfolgte eine Überprüfung ihrer Reaktivität mit konformationsspezifischen monoklonalen Antikörpern. Es wurden dazu zum einen der monoklonale HLA-Klasse I Antikörper W6/32, welcher die Schwerketten der HLA-Subtypen A, B und C erkennt (Chames et al., 2000), und desweiteren der monoklonale Antikörper Tü155, welcher nur peptidbeladene MHC-HLA-A2-Komplexe erkennt (Chames et al., 2000), eingesetzt.

An zweiten Tag wurde die mit pMHC beladene Platte dreimal mit PBS gewaschen und anschließend die unspezifischen Bindungsstellen mit 120 µl 2%M/PBS pro Well für mindestens 30 Minuten bei RT geblockt. Es folgte wiederum ein Waschschrift, bei dem dreimal mit PBS/0,1%Tween 20 und dreimal mit PBS gewaschen wurde.

Als nächstes wurden 50 µl 4%M/PBS in jedes Well pipettiert und dieses dann mit jeweils 25 µl des Phagenüberstandes aus Kapitel 5.2.4 vermischt. Diese Mischung wurde für 1-1,5 Stunden inkubiert und danach dreimal mit PBS/0,1%Tween 20 und dreimal mit PBS gewaschen. Zur Phagendetektion wurden dann in jedes Well 100 µl anti-M13-Antikörper, 1:2000 fach verdünnt in 2%M/PBS, pipettiert und die Suspension für eine Stunde bei RT inkubiert. Es folgte wiederum der oben beschriebene Waschschrift. Zur Detektion des anti-M13-Antikörpers wurde nun ein HRP-konjugierten-Anti-Maus-Antikörper, im Verhältnis 1:2000 verdünnt in 2%M/PBS, in die jeweiligen Wells pipettiert und die Platte für ebenfalls eine Stunde bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde viermal mit PBS/0,1% Tween 20 sowie einmal mit PBS gewaschen. Darauf folgte die Entwicklung des ELISA über eine Farbreaktion; diese wurde mit Hilfe des TMB-Peroxidase Kits durchgeführt. Dabei wurden die im Kit enthaltenen Lösungen A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und jeweils 100 µl/Well dieser Lösung auf die Platte gegeben. Abgestoppt wurde die Reaktion mit 1 M H₂SO₄.

6.2.6 **PCR-Amplifikation und Fingerprint der positiven Klone**

6.2.6.1 **Polymerase-Ketten-Reaktion**

Die im ELISA ausgewählten Klone wurden nun in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Saiki *et al.*, 1988) auf ihre Diversität hin überprüft.

Hierbei ermöglicht die PCR die gezielte *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten bis zu einer maximalen Größe von 12 kb. Die Vervielfältigung doppelsträngiger DNA verläuft exponentiell. Die PCR läuft in der Regel über 25 bis 50 Zyklen und wird in einem Thermocycler durchgeführt. Dieses Gerät erhitzt und kühlt die Proben präzise auf die für die jeweiligen Schritte gewünschte Temperatur. Zusätzlich besitzt es einen beheizbaren Deckel, so dass Verdunstungen effektiv verhindert werden können.

Jeder PCR-Zyklus verläuft in drei Schritten:

- **Denaturierung**
- **Primerhybridisierung (primer annealing)**
- **Strangverlängerung (Elongation)**

In dieser Arbeit wurden die DNA-Amplifikationen unter folgenden Bedingungen im Eppendorf Mastercycler Gradient durchgeführt:

- Denaturierung für 10 Minuten bei 94° C
 - Denaturierung für 45 Sekunden bei 95° C
 - Annealing für 45 Sekunden bei 58° C
 - Elongation für 90 Sekunden bei 72° C
- } 35 Zyklen

Pro Probe wurde kam ein PCR-Reaktionsgemisch, bestehend aus folgenden Komponenten, zur Anwendung:

- 0,4 µl Nukleotide (100 mM)
- 2 µl Taq-Reaktionspuffer (10x)
- 1,2 µl MgCl₂ (15 mM)
- 0,05 µl Primer 1 (100 mM)
- 0,05 µl Primer 2 (100 mM)
- 0,1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

- 15,2 µl H₂O_{dest}
- 1 µl DNA aus Mini-Präp

6.2.6.2 *Fingerprint der amplifizierten DNA*

Die mittels PCR amplifizierte DNA wurde nun in einem zweiten Schritt mit Hilfe des gängigen Restriktionsenzym BstNI verdaut.

Dazu wurden zu dem DNA-Mix aus der PCR folgende Komponenten zu jeder Probe hinzu pipettiert:

- 4 µl NEB2-Puffer (10x)
- 0,4 µl BSA (100x)
- 0,3 µl BstNI (10 U/µl)
- 15,3 µl H₂O_{dest}

Dieser Mix wurde dann für 2-3 Stunden bei 60° C verdaut und anschließend mit Hilfe eines 3%igen Agarosegels analysiert. Dabei zeigte jeder Klon ein anderes Bandenmuster, welches für ihn spezifisch ist und somit eine Aussage über die Diversität der Phagenklone erlaubt.

6.2.6.3 *Expression und Reinigung löslicher Fab-Antikörper*

6.2.6.3.1 *Expression der löslichen Fab-Antikörper*

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, Fab-Antikörper zu produzieren, die bei weiteren Untersuchungen wie z.B. ELISA, Western Blot, FACS, usw. eingesetzt werden können.

Das Prinzip der Methode liegt darin begründet, dass von *E.coli* produzierte Fab-Antikörper aus dem Periplasma der Bakterien herausgelöst werden können. Der Vorteil der Gewinnung aus dem Periplasma liegt darin, dass dort eine geringe Protease-Aktivität herrscht, weniger störende Proteine als im Zytoplasma oder im Überstand

vorkommen und der zu gewinnende Antikörper in einer höheren Konzentration vorliegt. Lässt man eine das Antikörper-kodierende Plasmid enthaltende Bakterienkultur in einem 2xTY-A-Medium mit wenig Glucose (0,1%) und Isopropylthio- β -galactosid (IPTG) induzieren, werden lösliche Fab-Antikörper produziert und in das Periplasma transportiert. Dort werden sie über vier Stunden hinweg aufkonzentriert. Im Periplasma wird dabei die Signalsequenz, welche den Transport der Proteine veranlasst hat, abgetrennt und der Antikörper wird durch korrekte Faltung sowie durch Ausbilden von Disulfidbrücken voll funktionsfähig.

Zur Gewinnung der Fab-Antikörper wurden TG1-Zellen, welche das Antikörper-kodierende Plasmid enthalten, zuerst in 50 ml 2xTY-AG-Medium inokuliert und über Nacht bei 30° C und 170 U/min wachsen gelassen. Aus dieser Kultur wurde am nächsten Morgen 8 ml entnommen und damit 800 ml 2xTY-A-(0,1%)Glucose-Medium angeimpft.

Diese Bakterienkultur wurde bei 37° C und 170 U/min bis zu einem OD₆₀₀ von 0,7-0,8 hochwachsen gelassen und dann 800 μ l einer 1 M IPTG-Lösung hinzu gegeben. Nun wurde die induzierte Bakterienkultur für vier Stunden bei 30° C und 170 U/min weiter wachsen gelassen. Durch Zugabe von IPTG kam es zur Produktion und Sekretion von Fab-Antikörpern ins Periplasma der Bakterien. Nach Ablauf der vier Stunden wurden die Bakterienzellen für 15 Minuten bei 3000 g bei 4° C in 500 ml-Abdrehgefäßen zentrifugiert. Um eine höhere Ausbeute zu erreichen, wurde das entstandene Pellet nun für mindestens zwei Stunden bei -70° C oder in flüssigem Stickstoff, in der Regel über Nacht, eingefroren. Durch das Einfrieren der Bakterien wurde die Bakterienmembran löchrig und somit später das Herauslösen der Peptide aus dem Periplasma erleichtert.

Das weitere Vorgehen erfolgte auf zwei verschiedene Methoden:

Methode 1:

Am nächsten Tag wurden die eingefrorenen Bakterienpellets bei RT aufgetaut, um nach Gewinnung der Fab-Antikörper mit der Reinigung zu beginnen. Zur Gewinnung wurde das nun aufgetaute Bakterienpellet mit je 8 ml eisgekühltem TS/EDTA-free Proteinaseinhibitor-Cocktail resuspendiert, die Suspension in ein steriles 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und dieses für 15 Minuten in einer Eisbox auf eine Wippe gelegt, so dass eine gleichmäßige Durchmischung erfolgen konnte. Währenddessen

wurden die Plastikzentrifugengefäße mit je 8,8 ml TS/Proteinaseinhibitorcocktail/H₂O_{dest} (Mischungsverhältnis 1:3) ausgespült; diese Lösung wurde dann ebenfalls zu der Bakteriensuspension gegeben und erneut 30 Minuten in der Eisbox auf der Wippe durchmischt. Schließlich wurde die Suspension für 15 Minuten bei 8000 g zentrifugiert; der daraus resultierenden Überstand enthielt nun die löslichen Fab-Antikörper, so dass mit der Reinigung dieser begonnen werden konnte.

Methode 2:

Das Pellet wurde nach dem Auftauen in 10 ml eiskaltem PBS pH 8/EDTA-free Proteinaseinhibitorcocktail resuspendiert. Diese Lösung wurde in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Abdrehgefäße wurden einmal mit 5 ml eiskaltem PBS pH 8/EDTA-free Proteinaseinhibitorcocktail nachgespült, um auch die restlichen noch verbliebenen Bakterien aufzunehmen. Diese Suspension wurde ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt. Die insgesamt 15 ml Bakteriensuspension wurden nun über Nacht bei 4° C auf einem Rollbrett gelagert, so dass sich die Fab-Antikörper unter kontinuierlicher Durchmischung langsam herauslösen konnten. Am nächsten Tag wurde diese Suspension für 20 Minuten bei 19000 g bei 4° C zentrifugiert. Die Fab-Antikörper befanden sich danach im Überstand und konnten nun über einen weiteren Schritt gereinigt werden.

Die Methode 2 benötigte im Gegensatz zur ersten Methode einen Tag mehr bis zur endgültigen Reinigung.

6.2.6.3.2 Reinigung der löslichen Fab-Antikörper

Bei der Reinigung der Fab-Antikörper macht man sich den 6xHistidin-Tag zu nutze; über diesen Tag werden die Fab-Antikörper an Talon®-Resins gebunden. Die Talon®-Resins enthalten Co²⁺-Ionen, woran die freien N-Atome des Histidin binden (Chaga et al., 1999; Porath, 1992).

Für die Reinigung wurden pro 800 ml-Bakterienkultur 500 µl homogene Talon®-Lösung benötigt. Die Talon®-Resins wurden in einem Reaktionsgefäß mit 50 ml PBS pH 8 einmal gewaschen. Zum Sammeln wurden sie dann bei 320 g für 3 Minuten

zentrifugiert und der Überstand verworfen. Auf dieses Talon®-Pellet wurde dann der in Kapitel 6.2.6.3.1 gewonnene Überstand gegeben und die Suspension für eine Stunde bei 4° C auf dem Rollbrett inkubiert, was zur Bindung der Fab-Antikörper mittels des Histidin-Tags an die Co^{2+} -Ionen der Talon®-Resins führte.

Nach der Inkubation wurde die Suspension für 3 Minuten bei 320 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig, ohne die Talon®-Resins dabei aufzuwirbeln, abgekippt und verworfen. Es folgte ein Waschschriff, bei dem die Talon®-Resins mit 50 ml PBS pH 8/0,1% Tween 20 für 10 Minuten bei 4° C auf dem Rollbrett gewaschen wurden. Nach einer erneuten Zentrifugation für 3 Minuten bei 320 g wurden die Talon®-Resins in 5 ml PBS pH 8 resuspendiert und in eine verschlossene Biorad-Schwerkraftsäule überführt. Die Säule wurde mit PBS pH 8/0,1% Tween 20 aufgefüllt und anschließend abgewartet, bis sich die Talon®-Resins auf dem Sieb gesammelt hatten. Nun wurde die Verschlusskappe der Säule geöffnet, die Waschlösung konnte langsam an den Resins vorbeilaufen. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Um die gebundenen Fab-Antikörper schließlich zu eluieren, wurde pro 500 µl Talon®-Resins 2 ml 100 mM Imidazol-Lösung auf die nun wieder geschlossenen Säulen pipettiert. Das Imidazol verdrängte dabei das Histidin aus der Bindung zum Co^{2+} aufgrund seiner höheren Affinität. Dies konnte man auch anhand eines Farbwechsels der Talon®-Resins erkennen, denn diese ändern ihre Farbe von einem eher farblosen Rosa zu einem intensiven Pink.

Die so eluierte Fraktion wurde dann über Nacht bei 4° C in Dialyseschläuchen gegen 5 Liter PBS unter kontinuierlichem Rühren dialysiert, wobei nach 2 Stunden ein Wechsel der Dialyseflüssigkeit erfolgte. Bei dieser Dialyse sollte das enthaltene Imidazol ausgewaschen werden.

Um die Reinheit der Peptide zu kontrollieren, wurden diese mittels SDS-PAGE (12%) aufgetrennt und anschließend einer Coomassie-Färbung unterzogen.

6.3 *Auftrennung von Proteinen im SDS-PAGE*

Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, kurz SDS-PAGE, ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld (Laemmli, 1970). Voraussetzung sind dabei Bedingungen, unter denen die Dissoziation der Proteine in die

einzelnen Polypeptide sowie Linearisierung gewährleistet ist. Nach Hitzedenaturierung und Verwendung reduzierender Agenzien binden die denaturierten Polypeptide das stark anionische Detergens SDS und erhalten so eine negative Ladung. Da die Menge des gebundenen SDS proportional zum Molekulargewicht des entsprechenden Polypeptids ist (Shapiro et al., 1967), wandern die SDS-Polypeptid-Komplexe bei der Elektrophorese nun in Abhängigkeit von der Größe des Polypeptids unterschiedlich weit im Polyacrylamidgel; somit wird eine Auftrennung der unterschiedlichen Polypeptide möglich. Die Verwendung von Zwei-Phasen-Gelen mit Konzentrierung und Ausrichtung aller SDS-Polypeptidkomplexe in einem möglichst kleinen Volumen in einem oberen Gelabschnitt („Stacking Gel“) und Auftrennung anschließend im unteren Gelabschnitt erhöht dabei die Auflösung der Gele (King & Laemmli, 1971).

Zur Durchführung wurden nach Standardprotokollen SDS-Polyacrylamidgele gegossen, mit gleichen Mengen der denaturierten Proteine (5 Minuten / 100° C) geladen und die Elektrophorese unter Verwendung eines Tris-Laufpuffers (Laemmli-Puffer) bei 200V/40 Minuten durchgeführt.

6.3.1 *Coomassie-Färbung*

Die Proteine können in den SDS-PAGE-Gelen durch Anfärben mit Coomassie sichtbar gemacht werden.

Dazu wurden die Gele gewöhnlich 30 Minuten lang in Coomassiefärbelösung geschwenkt. Dabei werden die aufgetrennten Proteine gleichzeitig mit Methanol und Essigsäure fixiert und mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Zum Entfärben wurden die Gele in Entfärbelösung auf einem Kipptisch geschwenkt, bis die Proteinbanden schließlich deutlich zu erkennen und der Hintergrund klar war.

6.3.2 *Westernblot*

Bei dieser Methode werden zunächst in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen. Dies geschieht im Semi-Dry-Verfahren. Dabei bleibt das bei der Auftrennung erhaltene Proteinmuster erhalten; es entsteht eine Kopie des Gels, wobei die Proteine auf der Membran immobilisiert werden: Sie binden bei niedriger Ionenstärke über hydrophobe Wechselwirkung an die Membran. Da sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine weitgehend erhalten bleibt, können diese durch den Einsatz spezifischer Antikörper immunologisch identifiziert werden (Burnette, 1981; Towbin et al., 1979).

Die für den Proteintransfer eingesetzte Polyvinyliden-Fluorid-Membran (PVDF Membran, Immobilion-Membran) musste vor Beginn des Proteintransfers präpariert werden: Dazu wurde sie in einem ersten Schritt für 15 Minuten in 100% Methanol eingeweicht, anschließend für 2 Minuten in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gelegt und zuletzt für mindestens 10 Minuten in Transfer-Puffer gegeben.

Der Aufbau des „Immunoblot-Sandwiches“ bei dem Semi-Dry-Verfahren geschah folgendermaßen:

- ein Blot-Papier oder auch drei Blätter Whatman-Papier (vorher ebenfalls in Transfer-Puffer getränkt)
- Membran
- Gel (mit Transfer-Puffer äquilibriert)
- Ein Blot-Papier oder auch drei Blätter Whatman-Papier (analog der obersten Schicht)

Nach Aufbau des Blots musste sorgfältig darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen mehr zwischen den einzelnen Schichten befinden.

Der Transfer erfolgte abhängig von der Gelgröße für 30-40 Minuten bei 23-25 V. Nach Abschluss des Transfers wurde der Erfolg des Blottens mittels einer Kontrollfärbung mit Ponceau-S Rot kontrolliert: Dazu wurde die Membran für 1 Minute in einer Ponceau-Lösung gefärbt und anschließend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ wieder entfärbt. Vor Entfärben musste noch der Längenmarker auf die Membran übertragen werden.

Die nun entfärbte Membran wurde schließlich getrocknet: Dazu wurde sie für 15 Sekunden in 100% Methanol getränkt und anschließend für ca. 15 Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurde die Membran in 5% MTBS über Nacht bei 4° C zum Blocken inkubiert. Dies diente der Blockade unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran. Am folgenden Tag erfolgte zunächst ein Waschschrift mit TBS und anschließend je nach Fragestellung eine immunologische Färbung mit den jeweiligen Antikörpern.

Allgemein erfolgt die Entwicklung gemäß folgendem Schema:

- primärer Antikörper, verdünnt in 5% MTBS, Inkubation für 60 Minuten
- dreimal Waschen mit TBS/0,1% Tween 20, dreimal Waschen mit reinem TBS
- sekundärer Antikörper HRP-konjugiert, verdünnt in 5%MTBS, Inkubation für 30-60 Minuten
- dreimal Waschen mit TBS/0,1% Tween 20, dreimal Waschen mit reinem TBS
- Entwicklung mit ECL

Das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym HRP (horseradish peroxidase) katalysiert hierbei die Oxidation des in der Entwicklungslösung enthaltenen Luminol, was zu einer Emission von Licht führt und somit einen Röntgenfilm belichten kann. Nach Entwicklung dieses Films stellen sich die positiven Banden schwarz dar.

In dieser Arbeit kam ein Westernblot bei zwei Fragestellungen zum Einsatz: Zum einem im Zuge der Klonierung einer BirA-enzymatischen Klonierungsregion im pCES1-Vektor (siehe Kapitel 3.2 Ergebnisteil) sowie zum anderen im Zuge der Oberflächenfärbung von mit rekombinanten Vaccinia Viren infizierten Zellen zur quantitativen Bestimmung der GFP-Moleküle (siehe Kapitel 4.2 Ergebnisteil).

Zur Entwicklung kamen dabei die im Folgenden aufgelisteten Antikörper in den jeweils genannten Verdünnungen zur Anwendung:

- Westernblot der biotinylierten und unbiotinylierten Fab-Antikörper (Kapitel 3.2 Ergebnisteil):
 - anti-c-myc (9E10) 1:600
 - rabbit-anti-mouse-HRP 1:3000
 - Streptavidin- HRP

- Quantifizierung der GFP-Expression (Kapitel 4.2 Ergebnisteil):
 - mouse-anti-GFP 1:3000
 - rabbit-anti-mouse- HRP 1:3000
 - rabbit-anti-Ubiquitin 1:1000
 - goat-anti-rabbit- HRP 1:3000

Der Nachweis von Ubiquitin erfolgte in diesem Fall auf der gleichen Membran, welche zuvor mit dem anti-GFP-Antikörper entwickelt wurde. Dazu wurde diese gestrippt, d.h. es wurden alle gebundenen Reagenzien entfernt: Das Strippen erfolgte durch zweimalige Inkubation der Membran für je 20 Minuten in einem Stripping-Puffer. Anschließend wurde die Membran nach Inkubation in 100% Methanol einem erneuten Block-Schritt in 5%MTBS unterzogen und schließlich mit dem anti-Ubiquitin-Antikörper gefärbt.

6.3.3 *ELISA zur Detektion von aufgereinigten Fab-Antikörpern*

Die Durchführung des ELISA erfolgte analog zu Kapitel 5.2.5. Statt des Phagenüberstandes kam nun eine Fab-Antikörper-Lösung mit einer Konzentration von 20 µg/ml zur Anwendung. Die Fab-Antikörper wurden mittels dem murinen anti-c-myc Antikörper 9E10 mit einer Konzentration von 60 µg/ml detektiert. Die weitere Entwicklung erfolgt wie in Kapitel 5.2.5 beschrieben.

6.4 *Klonierung einer BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion in den Vektor pCES1*

Die Klonierung einer BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion im Vektor pCES1 erfolgte in mehreren Schritten: Zu Beginn wurde aus der Bakterienkultur der ausgewählten Klone das Plasmid isoliert und aufgereinigt. Als nächstes konnte mittels der Enzyme NotI und EcoRI über einen Restriktionsverdau eine Linearisierung erfolgen; gleichzeitig wurde dabei die für den c-myc-tag, den Histidin-tag sowie ein Großteil der für das Protein III codierende Region herausgeschnitten. Dies zeigte sich im Aga-

rose-Gel in Form zweier Banden: Das aus dem Vektor herausgeschnittene Fragment mit einer Größe von 1250 bp sowie der restliche Vektor mit einer Größe von 4700 bp. In einem weiteren Schritt konnte nun der restliche pCES1-Vektor, in welchen die BirA-Region inkloniert werden sollte, aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und über GFX-Säulen gereinigt werden.

Die gereinigte DNA wurde schließlich einer Ligation zugeführt. Dabei wurde durch die Restriktionsenzyme NotI und EcoRI ein DNA-Fragment eingefügt. Dieses kodierte für folgende Regionen: die 14 Aminosäuren lange Hinge-Region (aufgrund ihres Ursprungs aus humanem IgA auch IgA-Hinge genannt), die 15 Aminosäuren lange Biotin-Akzeptor-Region (BAD) sowie den sechs Histidine umfassenden His-Schwanz. Nach Ligation wurde dieses DNA-Fragment mittels einer PCR amplifiziert. Dazu kamen die beiden Primer 5'BirAtag Not sowie 3'BirAtag EcoRI zum Einsatz. Die Ligation erfolgte gemäß des in Kapitel 6.4.3.5 erläuterten Protokolls über Nacht bei 4° C.

Im Folgenden ist die Aminosäuresequenz des eingefügten DNA-Fragments dargestellt:

SPSTPPTPSPSTPP AS GGLNDIFEAQKIEWH GSSKYKY HHHHHH		
IgA-Hinge	BAD	His-Schwanz

Nach Abschluss der Ligation erfolgte zunächst zur Kontrolle der Ligation eine Transformation des Vektors in den kompetenten *E.coli*-Stamm TG1. Diese wurden dann auf 2xTY-AG-Platten ausgestrichen, anschließend nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37° C Kolonien gepickt und in 2xTY-AG-Medium angeimpft. Aus den Bakterienkulturen wurde nun erneut das Plasmid isoliert. Der Erfolg der Ligation wurde schließlich mittels einer PCR kontrolliert: Dazu wurde zum einen der 5'Primer CH1, welcher in der CH1-Region des ursprünglichen pCES1-Vektors bindet, sowie zum anderen der 3'Primer BirAtag EcoRI, welcher in der neu klonierten BirA-Region bindet, verwendet. Da letztgenannter Primer nur bei erfolgreicher Ligation die DNA binden kann und somit nur dann eine Bande im Agarose-Gel sichtbar wird, erfolgte auf diese Weise eine Ligationkontrolle.

Anschließend wurde in einem nächsten Schritt die DNA in den *E.coli*-Stamm AVB101 [Avidity, Denver, CO] transformiert. Dieser enthält das Plasmid pBIRAcM, welches einerseits für das Enzym Biotin-Ligase kodiert, sowie andererseits auch für eine

Chloramphenicol-Resistenz kodiert. Nach Transformation des pCES1-Vektors bestand somit eine Doppel-Resistenz gegen Ampicillin und Chloramphenicol, welche entsprechend beachtet werden musste.

In einem letzten Schritt sollte schließlich noch nachgewiesen werden, dass es nach Klonierung der BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion nach wie vor zur Produktion strukturell intakter Fab-Antikörper kommt. Dazu wurden unter Beachtung der nun vorliegenden Doppelresistenz gemäß in Kapitel 6.2.6.3 beschriebenem Protokoll durch Zusatz von 50 μ M Biotin lösliche Fab-Antikörper produziert, auf ein SDS-Gel aufgetragen und schließlich das Biotin in einem Western-Blot mittels des Antikörpers Streptavidin-POX nachgewiesen.

Im Anschluss findet sich eine Übersicht über die Sequenzen der in diesem Teil der Arbeit beschriebenen Primer:

- 5'BirAtag Not: 5'-GGG GGG GCG GCC GCA TCT CCG TCT ACT C-3'
- 3'BirAtag EcoRI: 5'-GGG GGG GAA TTC TAG TGA TGG TGA TGA TG-3'
- 5'CH1: 5'-CCC TGA CCA GCG GCG TCC A-3'

6.4.1 Herstellung kompetenter Bakterien (CaCl_2 -Methode)

Als kompetente Bakterien bezeichnet man Stämme, die eine erhöhte Fähigkeit besitzen, Fremd-DNA im Zuge einer Transformation aufzunehmen.

Zu ihrer Herstellung wurden 30 ml LB-Medium mit 50 μ l des jeweiligen Bakterienstammes angeimpft und über Nacht bei 37° C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 2 ml entnommen und in 200 ml frisches LB-Medium überführt (Verdünnung 1:100). Die weitere Kultivierung erfolgte bis zu einem OD_{600} von ca. 0,45 bei einer Wellenlänge von 600 nm. Anschließend wurde die Kultur in einem 400 ml Zentrifugegefäß für 10 Min bei 3000 g (bei 4° C) zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 100 ml Transformationspuffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 25 Minuten. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 Min, 3000 g bei 4° C) wurde das Pellet in 20 ml Transformationspuffer resuspendiert, und nach Zugabe von 7%

DMSO und Aufteilung in mehrere Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der Aliquots erfolgte bei -80°C

6.4.2 Transformation

Als Transformation (*Lederberg & Cohen, 1974*) bezeichnet man eine Methode, bei der gelöste DNA in eine Bakterienzelle eingeschleust wird.

Während einer halbstündigen Inkubation eines Bakterien-DNA-Gemisches, bestehend aus Bakterien des *E.coli*-Stammes AVB101 sowie maximal 5% Mini-DNA und 1% DMSO, auf Eis lagerte sich die negativ geladene DNA spontan an Bakterienzellwände an. Dabei musste darauf geachtet werden, dass während dieser Inkubationszeit das Gemisch nicht geschüttelt wird. Bei einem Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42°C im Wasserbad wurde die Zellmembran der Bakterien kurzzeitig permeabel, so dass die DNA ins Innere der Zellen gelangen konnte. In der Regel wurde vor einer Kultivierung der Zellen in LB-Medium oder auf LB-Platten und nach einer ca. zwei Minuten dauernden Regeneration auf Eis eine Vorkultur für eine Stunde bei 37°C in 250 μl SOC-Medium durchgeführt. Dabei konnten die transformierten Bakterien die durch das aufgenommene Plasmid neu erworbenen Resistenzeigenschaften aufbauen.

6.4.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

6.4.3.1 TENS-Methode

Die Reinigung von Plasmid-DNA nach der TENS-Methode beruht auf der alkalischen Lyse von Zellen.

Zunächst wurden die Bakterienkulturen, welche über Nacht hochgewachsen waren, kurz abzentrifugiert und das Pellet in 50 μl Puffer P1 resuspendiert und in 300 μl TENS-Puffer aufgenommen. Dabei wurde durch die Komponenten NaOH, dem Detergens SDS und Tris-Base die Lyse vorangetrieben. Durch Zugabe von 150 μl 3 M

Na-Acetat wurden Proteine, genomische DNA und andere Zellbestandteile präzipitiert. Lediglich die im Verhältnis zu den anderen Bestandteilen relativ niedrigmolekularen Plasmide (und Salze) blieben in Lösung und wurden nach Zentrifugieren (für 4 Minuten bei 19.000 g) des „Zellschrotts“ mit 1 ml eiskaltem Ethanol (95%) gefällt und erneut bei 4° C für 10 Minuten bei 19.000 g zentrifugiert, so dass diese pelletiert wurden. Nach einem anschließenden Waschen in 70% eiskaltem Ethanol, bei der mit ausgefällte Salze entfernt wurden, wurde die DNA in 100 µl H₂O_{dest.} aufgenommen.

Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass man den Puffer schnell und billig selbst herstellen und die DNA-Isolation in einer relativ kurzen Zeitspanne durchführen kann. Allerdings ist die gewonnene Plasmid-DNA relativ unrein, so dass dieses Verfahren nur für analytische Zwecke zum Einsatz kommt.

6.4.3.2 *Isolation von DNA aus Agarosegelen*

Bei dieser Anwendung wurde DNA aus Agarosegelen isoliert. Dazu wurden die entsprechenden Gelstücke mit Capture-Puffer bei 60° C aufgeschmolzen.

Dieser begünstigt die Anlagerung von DNA an die Glasfibernmatrix und entfernt Proteine und Verunreinigungen. Nach Waschschrten erfolgt die Eluation in Wasser.

6.4.3.3 *Sequenzierung von DNA-Fragmenten*

Alle Sequenzierungen wurden in folgendem Institut durchgeführt:

Institut für Immunologie, Genetik und Transplantationsimmunologie Kaiserslautern
67613 Kaiserslautern

6.4.3.4 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen (RE's) sind Enzyme prokaryotischer Organismen, welche dazu dienen, das eigene Genom vor der Integration fremder DNA zu schützen, indem sie die fremden Moleküle durch Trennung ihrer Phosphodiesterbindungen zerstören. Die Erkennung von artfremder und eigener DNA erfolgt aufgrund unterschiedlicher Methylierungsmuster. Die Nomenklatur der RE's bezieht sich auf die Organismen, aus denen sie isoliert wurden. Hierbei geben die ersten drei Buchstaben Gattung und Art an, ein eventuell vorhandener vierter Buchstabe den Serotyp der Spezies. Die römische Ziffer bezieht sich dabei auf die aus dieser Spezies bereits isolierten Enzyme.

Ein Restriktionsverdau wurde durchgeführt, indem 0,5 µg DNA in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl 10-fach Restriktionspuffer von 2-5 U's* Enzym pro µg DNA in Fragmente geschnitten wurden. Bei Doppelverdauen (z.B. EcoRI und NotI) wurden die doppelten Pufferkonzentrationen gewählt, um unspezifisches Schneiden der Enzyme (Sternaktivität) zu verhindern. Alle Ansätze wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

*) Unter einer Unit (U) Enzym versteht man die Menge an Enzym, die notwendig ist, um 1 µg DNA bei 37° C vollständig zu verdauen.

6.4.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Während einer Ligation (*Sgaramella et al., 1970*) wird die Verknüpfung zueinander passender DNA-Fragmente von dem Enzym Ligase katalysiert.

Es wurde die aus dem T4-Bakteriophagen stammenden T4-Ligase verwendet. Die ATP-abhängige Ligation der beiden Fragmente erfolgt über Phosphodiesterbindungen. Für die Reaktion wurden äquimolare Mengen an Vektor und zu inserierendem DNA-Fragment bei 4° C über Nacht mit 5 U Enzym in Ligase-Puffer inkubiert. Mit der Hälfte eines solchen Ligationsansatzes wurden Bakterien transformiert.

6.5 *Oberflächenfärbung von Zellen und Durchflusszytometrie*

6.5.1 *Durchflusszytometrie*

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können physikalische und biochemische Eigenschaften von Zellen auf der Grundlage von Emission und Lichtbrechung untersucht werden.

Hierfür wird eine Zellsuspension in die partikelfreie schnellfließende Trägerflüssigkeit eines Durchflusszytometers gebracht. Hydrodynamisch fokussiert, fließen die Zellen einzeln durch einen scharf gebündelten Laserstrahl. Jede Zelle erzeugt Signale, indem sie Licht streut und Fluoreszenz emittiert. Die Strahlung wird über Linsen, Spiegel und Filter auf Photodetektoren geleitet und verstärkt. Der *forward scatter* (FSC) erfasst Licht, das im 180° Winkel durchgelassen wurde und misst damit die Größe der Zellen. Durch Detektion der seitlichen Streuung im *sideward scatter* (SSC) wird die Granularität der jeweiligen Zellen bestimmt. Sind die Zellen mit Fluoreszenzmolekülen verbunden, werden diese durch den Laserstrahl (Argonlaser, $\lambda=488$ nm) angeregt und geben die absorbierte Energie in Form von Licht höherer Wellenlänge wieder ab. Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) haben ein ähnliches Absorptionsspektrum, können aber durch die unterschiedlichen Maxima ihrer Emissionswellenlängen [E_{max} (FITC)=520 nm, E_{max} (PE)=575 nm] dennoch separat erfasst werden. Dies ermöglicht die Messung von zwei weiteren Parametern, der Grün- und Rotfluoreszenz.

6.5.2 *Oberflächenfärbung von Zellen*

6.5.2.1 *Färbung Peptid gepulster Zellen am Beispiel von T2-Zellen*

T2-Zellen entstammen einer humanen HLA-A*0201-positiven lymphoblastoiden B-Hybrid-Zelllinie, welche TAP (*transporter associated with antigen processing*)-defizient ist. Es existieren beim Menschen zwei Varianten des TAP-Proteins, TAP-1 und TAP-2, welche zur Proteinfamilie der ATP-Bindungskassetten (*ATP-binding-casette*, ABC) gehören. *In vivo* erfolgt die Induktion der Gene durch Interferone. TAP ist ein ATP-abhängiger Transporter in der Membran des ER und verantwortlich für

den Transport von Ionen, Zuckern, Aminosäuren und Peptiden in dessen Inneres. Dort erfolgt dann in Vesikeln die „Beladung“ der noch leeren MHC-Komplexe, welche somit nicht mit dem Zytosol in Kontakt stehen. Durch die TAP-Defizienz ist die intrazelluläre Beladung von MHC-I-Komplexen mit Peptiden reduziert, was schließlich dazu führt, dass sich „leere“ MHC-I-Komplexe auf der Zelloberfläche befinden. Diese leeren MHC-Komplexe können von extern mit Peptiden mit passendem Bindungsmotiv beladen werden. Die Peptide gehen dann mit dem MHC-Komplex eine stabile Bindung ein und werden somit auf der Zelloberfläche „präsentiert“.

Für die Färbung Peptid-gepulster T2-Zellen (Salter & Cresswell, 1986) wurden 10^6 Zellen in 1 ml FCS-freiem RPMI-Medium aufgenommen und einmal gewaschen. Danach wurden sie in jeweils 1 ml FCS-freiem RPMI-Medium, in welchem zuvor das entsprechende Peptid in der für die Färbung benötigte Endkonzentration gelöst wurde, aufgenommen und in ein Eppendorf-Zentrifugengefäß überführt. Dieses wurde dann für 1-1,5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension für vier Minuten bei 400 g und 4° C abzentrifugiert und zweimal mit jeweils 1 ml PBS/2%FCS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde das Zellpellet mit 100 µl eines Ansatzes aus PBS/2%FCS und dem primären Antikörper in fixer Konzentration resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Inkubation auf Eis verhinderte dabei eine eventuelle Aktivierung der Zellen durch die zugesetzten Antikörper und führte zu einem eingeschränkten Turnover zwischen Assoziation und Dissoziation der Fab-Antikörper vom jeweiligen Antigen.

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgten wiederum zwei Waschschrte mit je 1 ml PBS/2%FCS, um eventuell ungebundenen Antikörper abzuwaschen. Anschließend wurde der erste Sekundärantikörper hinzugegeben. Handelte es sich bei dem Primärantikörper um einen Phagen-Antikörper, wurde als sekundäres Reagenz Anti-M13-Antikörper 1:200 verdünnt hinzugegeben; handelte es sich um Fab-Antikörper, wurde als sekundäres Reagenz 9E10 mit einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet. Entwickelt wurde über anti-Maus-Biotin, 1:200 verdünnt eingesetzt, als letzter Schritt wurde der rote Farbstoff Streptavidin-PE (ebenso 1:200 verdünnt eingesetzt) zugegeben.

Während der Färbekaskade wurde ebenfalls nach jedem Färbeschritt mit je 1 ml PBS/2%FCS gewaschen. Nach dem abschließenden Waschschrte wurden die Zellen

zur Analyse in reinem PBS aufgenommen. Diese erfolgte via Becton Dickinson™FACScan®.

6.5.2.2 *Färbung von Karzinomzelllinien*

Zur Färbung der Karzinomzelllinien wurden diese, sofern es sich um adhärenente Zelllinien handelte, mittels PBS/2 mM EDTA aus der Zellkulturflasche herausgelöst und pro Probe in 1 ml FCS-freiem RPMI oder PBS aufgenommen. Für die eigentliche Färbung wurden ca. 5×10^5 Zellen pro Färbung benötigt, der Rest der Zellen wurde in einer neuen Zellkulturflasche erneut ausgesät.

Die Zellen wurden im ersten Schritt für eine halbe Stunde auf Eis mit dem primären Antikörper, in diesem Fall ein Fab-Antikörper, inkubiert und anschließend analog zu Kapitel 6.5.2.1 gewaschen. Als erster Sekundärantikörper wurde dann anti-human-Fab-Biotin in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem anschließenden Waschschrift erfolgte die Entwicklung über Streptavidin-PE 1:200 verdünnt für 10 Minuten auf Eis.

Die Färbung der Kontrollen W6/32 und anti-HLA-A2-Antikörper BB7.2 (Parham & Brodsky, 1981) erfolgte analog den beiden oben genannten Methoden. Als sekundärer Antikörper diente in diesem Fall jedoch anti-Maus-Biotin in einer Verdünnung von 1:200.

6.5.2.3 *Blockversuche auf Karzinomzelllinien*

Diese Blockversuche hatten zum Ziel, die Ergebnisse aus den Analysen mit unbiotinylierten Fab-Antikörpern zu validieren bzw. die Spezifität der Bindung der Fab-Antikörper auf Karzinomzellen zu untermauern. Dazu benötigte man einen Fab-Antikörper biotinyliert sowie unbiotinyliert. Die dazu verwendeten Zellen wurden, wie in Kapitel 6.5.2.2 erläutert, aufgenommen und in 1,5 ml-Eppendorf-Zentrifugengefäße überführt. Als primärer Antikörper wurde in diesem Fall ein unbiotinylierter Fab-Antikörper mit einer Konzentration von 100-150 µg/ml eingesetzt, wobei vorausgesetzt wurde, dass dieser in der Lage ist, auf Zellen zu binden. Während einer In-

kubationszeit von 1 Stunde auf Eis sollte dieser dann das Epitop für weitere Antikörper „blockieren“. Es folgte ein Waschschrift mit 1ml PBS/2%FCS und anschließend die Zugabe des biotinylierten Fab-Antikörpers mit einer Konzentration von 25 µg/ml sowie eine Inkubation von 45 Minuten auf Eis. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschriffe mit je 1 ml PBS/2%FCS. Als sekundärer Antikörper wurde nun Streptavidin-PE für 10 Minuten 1:200 verdünnt eingesetzt. Nach erneutem zweimaligem Waschen werden die Zellen in reinem PBS aufgenommen und via Becton Dickinson™FACScan® analysiert.

Erfolgte durch den unbiotinylierten Antikörper eine erfolgreiche Blockade des Epitops auf der Zelloberfläche, sollte der anschließend eingesetzte unbiotinylierte Fab-Antikörper keine Bindungsmöglichkeit mehr haben und somit auch keine Detektion mittels Durchflusszytometrie mehr möglich sein.

6.5.2.4 Färbung von viral infizierten Zelllinien

Zur Detektion endogen prozessierter und auf der Zelloberfläche mittels HLA-A*0201 präsentierter Peptide eignet sich neben der Oberflächenfärbung von Karzinomzellen auch die Infektion geeigneter Zelllinien mit Viren, welche in ihrer DNA die Gensequenz für das entsprechende Protein tragen.

In diesem Fall wurden rekombinante Vaccinia-Viren verwendet, welche in ihrem Genom entweder die Sequenz für das Peptid Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELAGIGILTIV (ELA) oder für A27L-mutierte Melan-A Protein enthalten; beide jeweils in Verbindung mit GFP-Ubiquitin, so dass es zu einer äquivalenten Produktion von GFP kommt.

Im Folgenden wird die jeweilige Vektorkarte dargestellt, wie sie in dieser Versuchsreihe zur Anwendung kam:

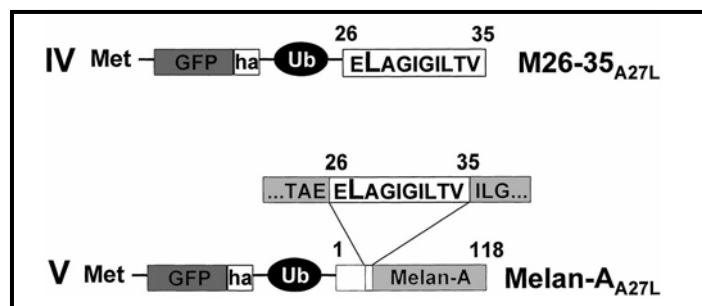


Abbildung 4: schematische Darstellung des zur Infektion verwendeten Vektors (Valmori et al., 2000). Der Vektor wurde uns freundlicherweise von Herrn F. Levy, Lausanne, zur Verfügung gestellt (Valmori et al., 2000).

In dieser Arbeit wurden HLA-A*0201-positive EBV-immortalisierte B-Zellen mit den rekombinanten Vaccinia Viren (in der Folge als rVV bezeichnet) infiziert.

Zur Infektion wurde pro Zelle 10 pfu (*plaque forming units*) Vaccinia-Virus bei einer bereitgestellten Viruskonzentration von 10^6 pfu/ml verwendet. Es wurden pro Probe $4 \cdot 10^5$ Zellen in 1,5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und die entsprechende Menge Virus dazu pipettiert. Anschließend erfolgte die Infektion für 1,5–2 Stunden. Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die einzelnen Proben bei 400 g für 4 Minuten zentrifugiert, zweimal mit jeweils 1 ml PBS/2%FCS gewaschen, das entstehende Zellpellet in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und schließlich über Nacht im Brutschrank inkubiert, so dass eine Prozessierung und Präsentation der Melan-A Peptide auf der Zelloberfläche erfolgen konnte.

Am folgenden Tag wurden die Zellen in reinem PBS aufgenommen und anschließend mit den entsprechenden Fab-Antikörpern (biotinyliert oder unbiotinyliert) und der jeweiligen Kaskade an Sekundärantikörpern gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie erfolgte schließlich einerseits eine Kontrolle der Infektionseffizienz sowie andererseits eine Analyse der Bindung der Fab-Antikörper.

Als Negativkontrolle diente in dieser Versuchsreihe die Oberflächenfärbung nicht infizierter EBV-immortalisierter B-Zellen mit den entsprechenden Fab-Antikörpern, bei welchen keine Änderung der Fluoreszenzintensität zu erwarten war.

6.5.3 *Quantitative Bestimmung der PE-Moleküle nach Oberflächenfärbung*

Zur Bestimmung der nach Infektion von EBV-immortalisierter B-Zellen mit rVV auf der Zelloberfläche vorhandenen ELA/HLA-A*0201-Komplexen erfolgte die quantitative Bestimmung der PE-Moleküle nach Oberflächenfärbung mit den Fab-Antikörpern E6-b und H4-b. Hierzu kamen PE-Kalibrierungsbeads zum Einsatz, welche gemäß den Herstellerinformationen verwendet wurden.

Nach der Oberflächenfärbung wurden die Beads unter gleichen Geräteeinstellungen mittels Durchflusszytometrie analysiert und die gemessenen Fluoreszenzintensitäten im PE-Kanal notiert. Gleichzeitig wurden die vom Hersteller angegebenen Verhältnismerte von PE-Molekül:Beads notiert.

Die Auswertung und letztlich die Bestimmung der PE-Moleküle pro Zelle erfolgte schließlich gemäß Herstellerprotokoll.

6.6 *CTL-Inhibition mittels IFN- γ -ELISA*

Das Prinzip dieser Versuchsreihe besteht darin, mittels Fab-Antikörper eine Inhibition der Bindung spezifischer zytotoxischer T-Zellen an einen MHC-Peptid-Komplex auf APCs zu erzielen. Gelingt diese Inhibition, so lässt sich daraus schließen, dass der jeweilige Fab-Antikörper den MHC-Peptid-Komplex in gleicher Weise zu binden vermag wie ein T-Zell-Rezeptor.

Es stehen hierfür eine große Anzahl möglicher Methoden zur Verfügung, beispielsweise ein IFN- γ -ELISA oder der Nachweis mittels eines ELISpots (*Enzyme Linked Immuno Spot Assay*). In dieser Arbeit kam der IFN- γ -ELISA zur Anwendung. Das Prinzip besteht darin, dass man IFN- γ , welches von zytotoxischen T-Zellen nach Erkennung des für ihren T-Zell-Rezeptor spezifischen MHC-Peptid-Komplexes ausgeschüttet wird, mittels ELISA detektiert und quantitativ bestimmt wird.

Die Versuchsreihe gliederte sich dabei in mehrere Einzelschritte und erstreckte sich über zwei Tage:

1. Schritt: Inkubation der APC mit den jeweiligen Fab-Antikörpern

In dieser Arbeit kamen als APCs Tumorzellen zur Anwendung, welche mit dem Melan-A₂₆₋₃₅ ELA-Peptid als Antigen von extern beladen wurden: Die Tumorzellen wurden dabei gemäß der in 5.4.2.1 beschriebenen Methode für ca. 1 Stunde im Brutschrank mit den Peptiden inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 200 g für 8 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt, das Zellpellet anschließend mit einer Verdünnungsreihe der Fab-Antikörper resuspendiert und schließlich für ca. 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Fab-Antikörper konnten in dieser Inkubationszeit an die mit ELA beladenen MHC-Komplexe binden. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die APCs bei RT mit 120 Gy bestrahlt.

2. Schritt: Inkubation der APC mit Melan-A spezifischen CTLs

Nach Bestrahlung der APCs erfolgte die Aufteilung der Suspension in eine 96-Well-Rundbodenplatte, wobei pro Konzentrationsstufe der Fab-Antikörper ein Doppelan-satz angelegt wurde. Nach Aufteilung in die entsprechenden Wells wurde pro Well die entsprechende Zahl an CTLs zugefügt. Als Positivkontrolle dienten mit Melan-A₂₆₋₃₅ ELA beladene APCs, welche zuvor nicht mit Fab-Antikörpern inkubiert wurden. Als Negativkontrollen dienten einerseits mit Melan-A₂₆₋₃₅ ELA beladene APCs, welche mit einem irrelevanten, nicht Melan-A bindenden Fab-Antikörper inkubiert wurden, sowie andererseits APCs, welche mit einem Kontrollpeptid inkubiert wurden.

APCs und CTLs wurden über Nacht im Brutschrank koinkubiert.

3. Schritt: Coaten der ELISA-Platte mit einem anti-IFN- γ -Antikörper

Das Coaten erfolgte zeitgleich mit der Co-Inkubation der APCs mit den CTLs über Nacht im Brutschrank. Dazu wurde ein anti-IFN- γ -Antikörper, welcher die Funktion eines Fangantikörpers einnimmt, auf eine Konzentration von 720 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt, pro Well 50 μl der Verdünnungslösung in eine Nunc-Maxisorb®-Platte pipettiert und über Nacht bei 4° C im Kühlschrank inkubiert.

4. Schritt: Entwicklung des ELISA

Am darauf folgenden Tag erfolgte die Entwicklung des ELISA. Dazu wurde in einem ersten Schritt die mit dem anti-IFN- γ -Antikörper beladene Nunc®-Maxisorb-Platte viermal mit PBS/0,1%Tween sowie zweimal mit PBS gewaschen und anschließend

mit einer 1%igen BSA-Lösung für ca. 1,5 Stunden bei RT geblockt. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Zugabe des Überstandes der einzelnen Ko-Inkubationsansätze aus APCs und CTLs. Der Überstand enthielt das von den CTLs sezernierte IFN- γ . Nach einer Inkubationszeit von ca. 1,5 Stunden, in der das IFN- γ an den immobilisierten anti-IFN- γ -Fangantikörper binden konnte, und einem erneuten Waschschrift erfolgte die Detektion des IFN- γ . Als Detektionsantikörper kam ein weiterer anti-IFN- γ -Antikörper, welcher jedoch ein anderes Epitop des IFN- γ bindet als der immobilisierte Antikörper, zum Einsatz. Dieser Antikörper war biotinyliert und wurde mit PBS auf eine Endkonzentration von 18 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt; anschließend wurden pro Well 50 μl dieser Verdünnung eingesetzt und ca. 1 Stunde inkubiert. Zur Verstärkung des Signals erfolgte nach erneutem Waschen der Platte die Zugabe einer Streptavidin-gekoppelten Meerrettich-Peroxidase, wobei es zu einer kovalenten Bindung zwischen Streptavidin und Biotin kam. Die Enzymlösung wurde 1:200 in PBS verdünnt und pro Well ebenfalls 50 μl dieser Verdünnung für 20 Minuten inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift erfolgte die Entwicklung des ELISA über eine Farbreaktion gemäß dem in 5.2.5 beschriebenen Protokoll.

7 Kinetikanalysen mittels Oberflächenplasmonresonanz

Kinetikanalysen mittels Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) werden durchgeführt mit dem Ziel, Aussagen über die Bindungsfähigkeit eines Fab-Antikörpers gegen sein Antigen, hier ein pMHC, treffen zu können. Dazu bestimmt man unter standardisierten Bedingungen die Assoziation, Dissoziation sowie die Affinität der jeweiligen Fab-Antikörper. Die Technik der Oberflächenplasmonresonanz stellt eine direkte Methode dar, Bindungskonstanten zwischen einem immobilisierten (hier pMHC) sowie einem löslichen Liganden (hier Fab-Antikörper) zu bestimmen. Sowohl die Komplexbildung als auch die –dissoziation können quasi „online“ verfolgt und anschließend direkt ausgewertet werden. Das Prinzip der Messungen lässt sich relativ einfach beschreiben: Mittels Oberflächenplasmonresonanz wird eine Massenzunahme detektiert.

Im Mittelpunkt der Analysen steht ein Sensor Chip, in diesem Fall ein CM5-Chip, auf welchem die Interaktionen zwischen beiden Liganden statt finden. Dieser besteht aus

einem Glasträger, welcher auf einer Seite einen aufgedampften Goldfilm besitzt. Auf dieser dünnen Goldschicht befindet sich eine Dextranmatrix mit freien Carboxylgruppen, welche letztlich pMHC immobilisieren. Folgende Abbildung stellt den Aufbau eines Sensor Chips mit dem zugehörigen Flusssystem schematisch dar:

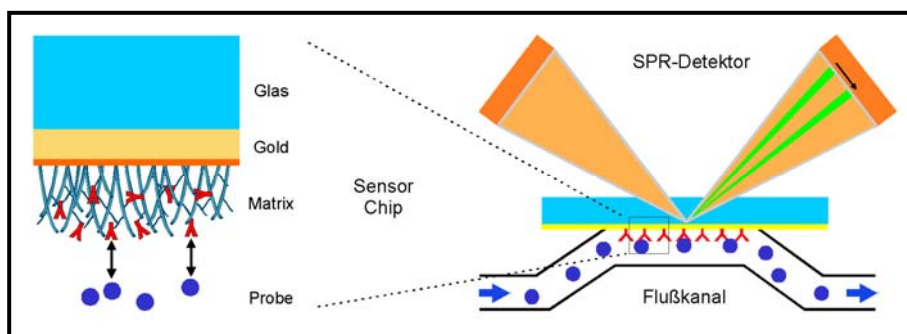


Abbildung 5: Aufbau eines Sensor Chips (links) mit dem zugehörigen Flusssystem (rechts)

An der Goldseite des Chips befindet sich ein Flusssystem, über welches einerseits die Pufferlösungen sowie andererseits die jeweiligen löslichen Fab-Antikörper mit der Oberfläche des Chips – und somit auch mit dem immobilisierten pMHC – in Kontakt treten. An der Glasseite des Chips liegt wiederum der optische SPR-Detektor, welcher, vereinfacht gesagt, die an die Dextranmatrix angelagerte Masse misst und direkt in Form eines Signalauschlages (Einheit: Response Unit, kurz: RU) darstellt.

Das Detektionsprinzip lässt sich wie folgt beschreiben: Von der Glasseite her trifft monochromatisches, polarisiertes Licht auf die Chipoberfläche, wo dann ein Teil reflektiert und ein anderer Teil absorbiert wird. Trifft es jedoch in einem bestimmten – für jede sich auf der Chipoberfläche befindende Masse charakteristischen und zur Beladung der Chipoberfläche proportionalen – Winkel auf die Oberfläche, so kommt es zu einer Totalreflexion. Im Bereich der Totalreflexion kommt es auf der Goldseite des Chips zur Induktion elektromagnetischer Wellen, welche schließlich mit dem reflektierten Strahl in Resonanz stehen. Deren elektromagnetische Feldkomponenten treten aus der Goldschicht heraus, wo sie von immobilisierten Liganden absorbiert oder phasenverschoben werden können. Dies wirkt sich schließlich wieder auf den Totalreflexionswinkel aus. Durch Anregung der OberflächenElektronen auf der Rückseite der Goldfolie kommt es ferner zur Bildung von Elektronendichte-Wellen, auch Oberflächenplasmon genannt.

Verfolgt man den zeitlichen Verlauf der Änderung des Reflexionswinkel – und somit auch der Änderung der Masse auf der Chipoberfläche – erhält man schließlich kinetische Informationen über den Bindungsvorgang.

Die Immobilisierung der pMHC wurde nach folgendem Prinzip durchgeführt: Die Carboxylgruppen der Dextranmatrix des CM5-Chips mussten in einem ersten Schritt aktiviert werden. Dies geschah mit Hilfe der beiden Substanzen 0,2 M N-Dimethylaminopropyl-carbodiimid (EDC) sowie 0,05 M N-Hydroxysuccinimid (NHS), injiziert mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$: EDC reagierte mit den Carboxylgruppen der Dextranmatrix zu einem O-Harnstoff-Derivat, unterstützt wurde diese Reaktion im Sinne einer Stabilisierung durch NHS. Das entstandene Produkt war wiederum elektrophil, so dass eine Reaktion mit nukleophilen Aminen begünstigt wurde. In diesem Fall wurde Streptavidin in einer Konzentration von 0,2 mg/ml (in 10 mM Na-Acetat pH 4,5) kovalent und unter EDC-Freisetzung an die Dextranmatrix gebunden. Abschließend wurden die restlichen freien Carboxylgruppen mit 1 M Ethanolaminhydrochlorid geblockt. In einem nun folgenden zweiten Schritt wurde mittels einer Streptavidin-Biotin-Bindung der pMHC immobilisiert. Dabei musste darauf geachtet werden, bei verschiedenen pMHC jeweils etwa die gleiche Menge zu immobilisieren. Ferner wurde bei vier Flusszellen in der Regel eine nicht mit einem pMHC beladen, diese diente dann als Referenzzelle.

Nach Zugabe der pMHC und Stabilisierung dieser mit jeweils 5 μl 1 M NaCl konnte in einem dritten Schritt mit der Zugabe der Fab-Antikörper, gelöst in HBS-EP Puffer begonnen werden.

Im Sensorgramm stellte sich dies wie folgt dar:

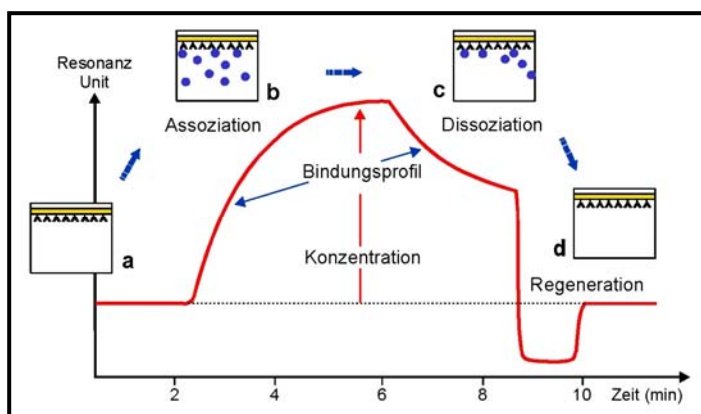


Abbildung 6: Darstellung eines Sensorgramms, bestehend aus Basislinie (a), Assoziationsphase nach Injektion (b), Dissoziationsphase (c) sowie Regeneration zur Basislinie (d)

Nach Zugabe des Fab-Antikörpers erfolgte, ausgehend von der Basislinie, eine Zunahme der Masse auf der Chipoberfläche, welche sich im Sensorgramm als RU-Zunahme äußerte. Dies wird als Assoziationsphase bezeichnet. Nach Ende der Injektion kam es – abhängig vom Bindungsvermögen des jeweiligen Fab-Antikörpers – zu einer mehr oder weniger schnellen Dissoziation vom immobilisierten pMHC. War nach einer bestimmten Dissoziationszeit die Basislinie nicht wieder erreicht - befand sich demnach noch Fab-Antikörper gebunden am pMHC - so musste eine chemische Regeneration des pMHC erfolgen. Im Idealfall wurde einzig der Fab-Antikörper entfernt und die gesamte Menge pMHC auf der Chipoberfläche belassen. Eine erneute Injektion konnte erst nach erneuter Rückkehr zur Basislinie erfolgen. Ausgewertet wurden schließlich die eigentlichen Bindungskurven abzüglich der Referenzkurve, welche nur Streptavidin und kein pMHC enthält. Die Bestimmung von Assoziations-, Dissoziations- sowie Affinitätsparameter erfolgte mittels eines Langmuir 1:1 Bindungsmodells. Verwendet wurde hierzu dafür die Biacore EvaluationSoftware 3.1.

IV Ergebnisse

1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Selektionen

Der erste Schritt der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Selektion, Generierung und Charakterisierung von Fab-Antikörpern, welche das immunogene Tumorpeptid Melan-A₂₆₋₃₅ (EAAGIGILTV) erkennen.

Die Selektionen wurden gegen EAA/HLA-A*0201 durchgeführt. Es wurden insgesamt drei Selektionsrunden durchgeführt, wobei mit jeder weiteren Runde die Konzentration des MHC-Peptid-Komplexes weiter reduziert wurde. Ziel war es, nach der dritten Selektionsrunde eine möglichst hohe Spezifität und Affinität zu erzielen. Vor und nach jeder Selektionsrunde wurden jeweils die In- und Output-Konzentration bestimmt, welche im Folgenden aufgelistet sind:

- 1. Runde
 - Input: $1,4 \cdot 10^{13}$ cfu/ ml
 - Output: $1 \cdot 10^9$ cfu/ ml
- 2. Runde
 - Input: nicht bestimmt
 - Output: $7,2 \cdot 10^7$ cfu / ml
- 3. Runde
 - Input: $4,4 \cdot 10^{13}$ cfu/ ml
 - Output: $3,2 \cdot 10^7$ cfu/ ml

Nach den Selektionen erfolgte zunächst ein erstes Screening. Dabei wurde Phagenüberstand aus einem Phagen-Rescue von zufällig aus der zweiten und dritten Runde gepickten Klonen im ELISA gegen den relevanten und einen irrelevanten MHC-Peptid-Komplex als Kontrolle getestet, in diesem Fall kam der SSX2₄₁₋₄₉/HLA-A*0201 zur Anwendung

In diesem ersten Screening wurden 25 Klone identifiziert, die spezifisch gegen den relevanten EAA/HLA-A*0201 reagierten. Nun sollte zunächst die Frage beantwortet werden, ob es sich bei den 25 selektionierten Klonen um verschiedene Klone han-

delt. Dazu wurden diese mittels PCR und anschließendem Restriktionsverdau mit BstNI des PCR-Produktes analysiert. Die daraus resultierenden DNA-Fragmente unterschiedlicher Klone, sogenannte Fingerprints, wurden in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid visualisiert:

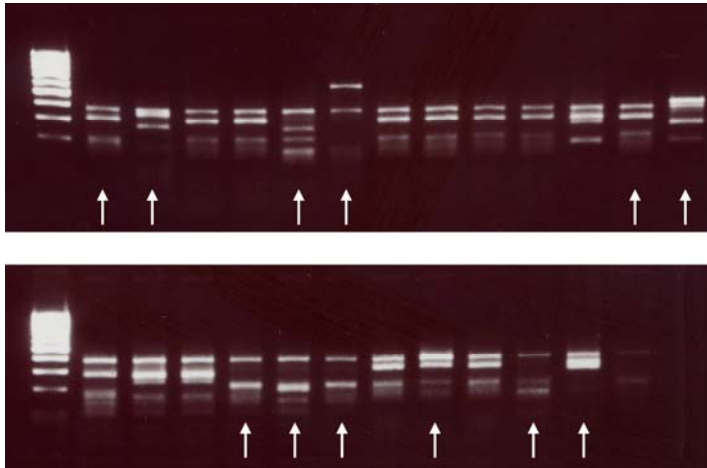


Abbildung 7: Fingerprints der 25 selektierten Klone, Markierung der 12 unterschiedlichen Klone (weißer Pfeil); ganz links jeweils 1kb-Längenmarker.

Aus den Fingerprints der PCR-Produkte ergab sich, dass sich unter den 25 selektierten Klonen 12 verschiedene Klone befanden.

Im Folgenden sind die Fingerprints der 12 Klone, welche dann Gegenstand der weiteren Arbeit wurden, dargestellt:

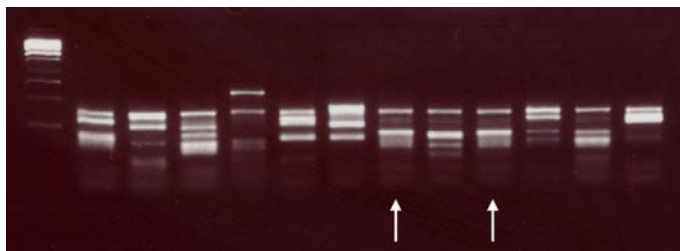


Abbildung 8: Fingerprints der 12 ausgewählten Klone; ganz links 1kb-Längenmarker.

Bei genauer Betrachtung der Fingerprints der 12 Klone fällt auf, dass die beiden markierten Fingerprints (weiße Pfeile) zu identischen Klonen zu gehören scheinen. Diese Vermutung konnte durch eine Sequenzierung, welche verschiedene Sequenzen lieferte, widerlegt werden.

2 *Bestimmung der Spezifität der selektionierten Klone*

2.1 *Produktion von Fab-Antikörpern*

Die Produktion der löslichen Fab-Antikörper erfolgte gemäß dem im Teil „Material und Methoden“ dargelegten Protokoll. Nach erfolgter Reinigung wurde die Reinheit der produzierten Proteine überprüft; dazu wurden diese jeweils mit einem reduzierenden und einem nicht-reduzierenden Ladepuffer nach Denaturierung bei 96° C für ca. 5 Minuten auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Durch das im reduzierenden Ladepuffer enthaltene β -Mercaptoethanol kommt es zur Aufspaltung der Disulfidbrücke und somit zur Trennung von Leicht- und Schwereketten des Fab-Antikörpers. Im SDS-Gel zeigt sich diese Tatsache dergestalt, dass der Fab-Antikörper mit intakter Disulfidbrücke bei ca. 50 kDa, die Leicht- und Schwereketten bei ca. 20-30 kDa detektiert werden:

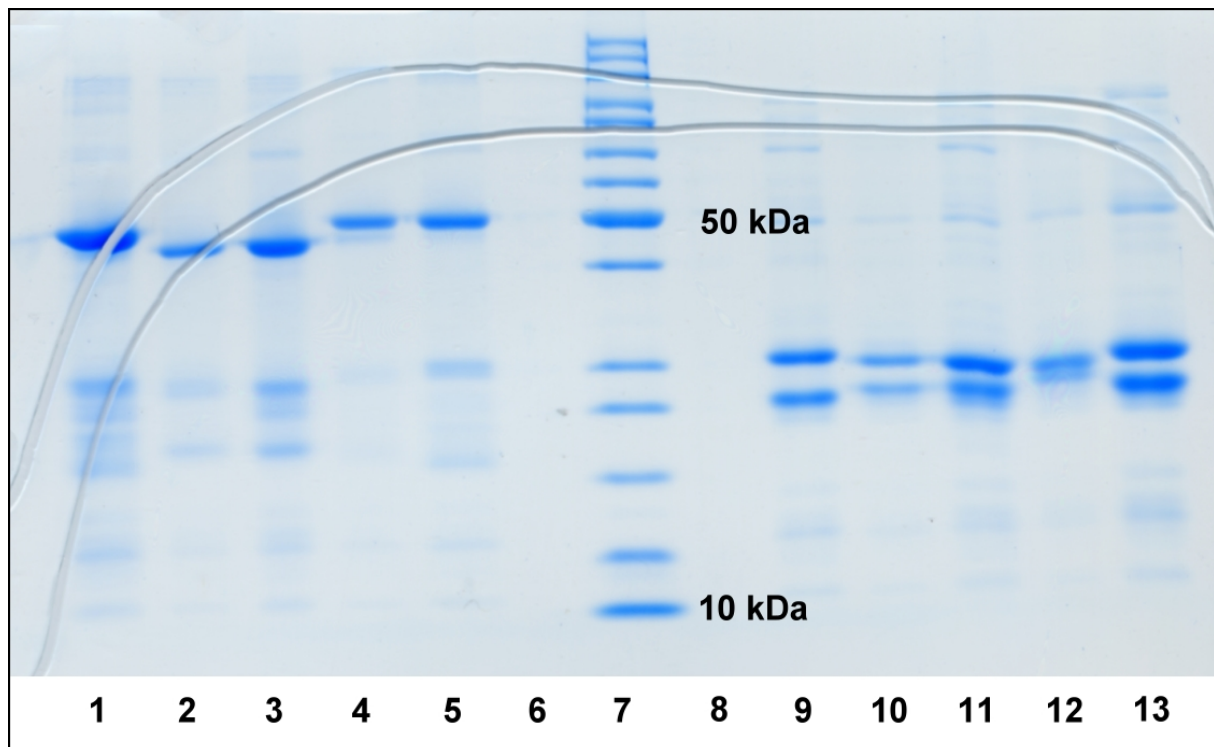


Abbildung 9: Fab-Antikörper fünf ausgewählter Klone nach elektrophoretischer Auftrennung und Visualisierung im SDS-Gel; 1-5: reduzierender Ladepuffer; 6: Negativkontrolle; 7: Längenmarker; 8: Negativkontrolle; 9-13: nicht reduzierender Ladepuffer

Es konnte somit von einer korrekten Produktion der Fab-Antikörper ausgegangen werden.

2.2 *Bestimmung der spezifischen Reaktivität selektierter Klone gegen rekombinante MHC-Peptid-Komplexe*

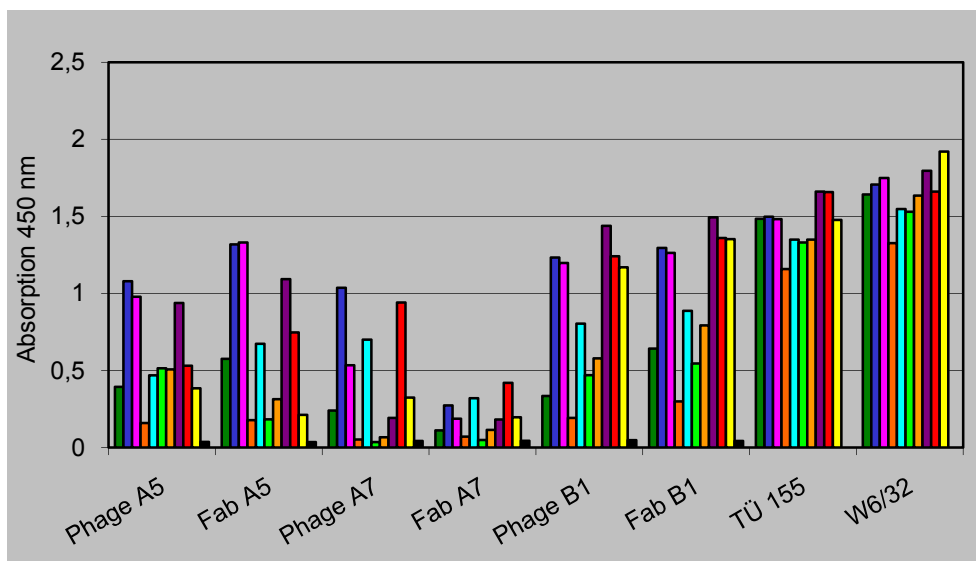
Nachdem von den 12 selektierten Klonen lösliche Fab-Antikörper produziert wurden, erfolgte in einem nächsten Schritt die Bestimmung der spezifischen Reaktivität dieser Klone gegen rekombinante MHC-Peptid-Komplexe im ELISA. Dazu wurden Phagen und Fab-Antikörper der jeweiligen Klone gegen ein erweitertes Panel an MHC-Peptid-Komplexen in einem identischen Versuchsaufbau getestet.

Folgende MHC-Peptid-Komplexe wurden verwendet:

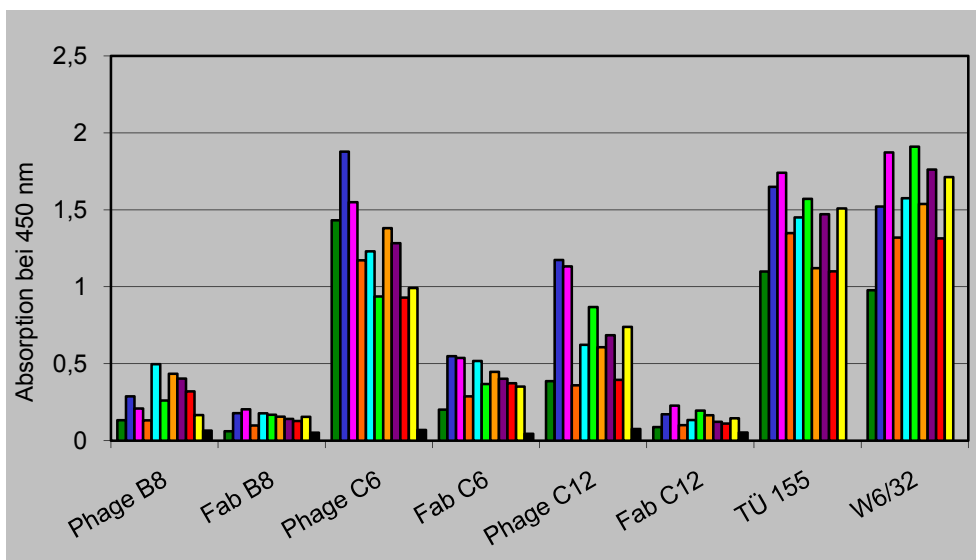
- EAA/ HLA-A*0201
- ELA/ HLA-A*0201
- AA/ HLA-A*0201
- LA/ HLA-A*0201
- AL/ HLA-A*0201
- SSX2₄₁₋₄₉/ HLA-A*0201
- G250-GLA/ HLA-A*0201
- G250-GLL/ HLA-A*0201
- G250-HLA/ HLA-A*0201
- CMV pp65/ HLA-A*0201

Die Fab-Antikörper wurden hierbei in der Konzentration 10 µg/ml, die Phagen 1:300 verdünnt eingesetzt.

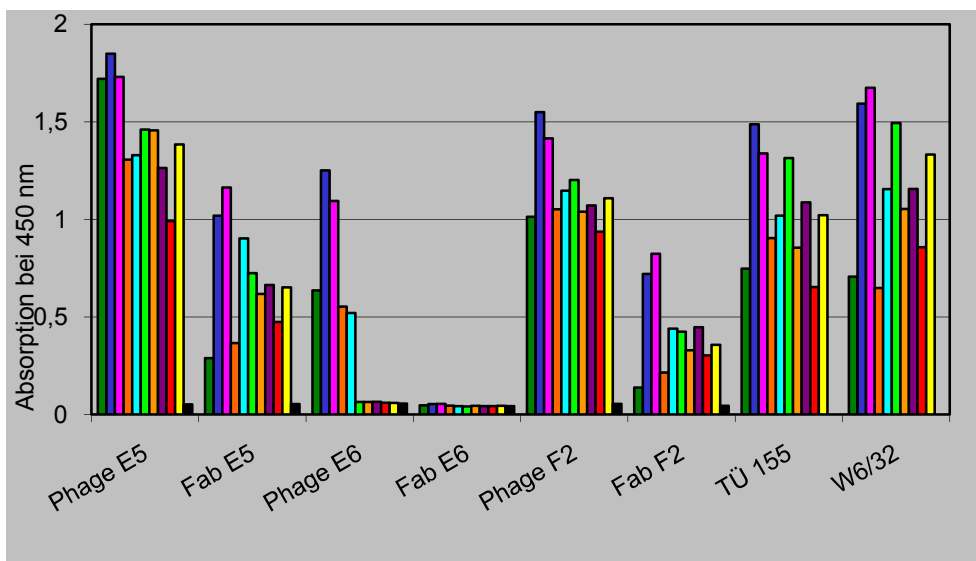
A)



B)



C)



D)

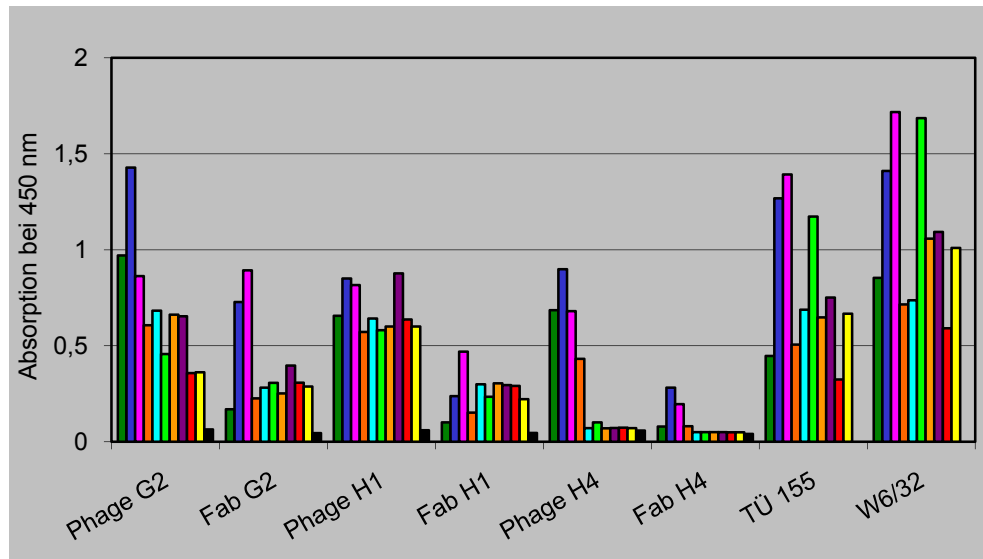


Abbildung 10: ELISA mit Phagen und Fab-Antikörpern der 12 Klone sowie der Positivkontrollen Tü 155 und W6/32

A) A5, A7, B1; B) B8, C6, C12; C) E5, E6, F2; D) G2, H1, H4

Für alle gilt folgende Farbcodierung: EAA/ HLA-A*0201 (dunkelgrün); ELA/ HLA-A*0201 (dunkelblau); AA/ HLA-A*0201 (rosa); LA/ HLA-A*0201 (orange); AL/ HLA-A*0201 (hellblau); SSX2₄₁₋₄₉/ HLA-A*0201 (hellgrün); G250-GLA/ HLA-A*0201 (ockergelb); G250-GLL/ HLA-A*0201 (violett); G250-HLA/ HLA-A*0201 (rot); CMV pp65/ HLA-A*0201 (gelb); Negativkontrolle: Phage bzw. Fab-Antikörper auf biotinyliertem BSA mit Streptavidin und sekundären Antikörpern (schwarz)

Die Ergebnisse des ELISA zeigen, dass lediglich die Klone E6 und H4 Peptid-spezifisch mit dem Melan-A/ HLA-A*0201 interagieren. Die anderen Klone zeigten eine Kreuzreaktivität gegen MHC-Peptid-Komplexe, die andere HLA-A*0201-restringierte Peptide präsentieren. Da das durch die rekombinanten Fab-Antikörper der Klone E6 und H4 gemessene Signal sehr niedrig war, wurde das Experiment mit einer höheren Antikörperkonzentration von 40 µg/ml wiederholt.

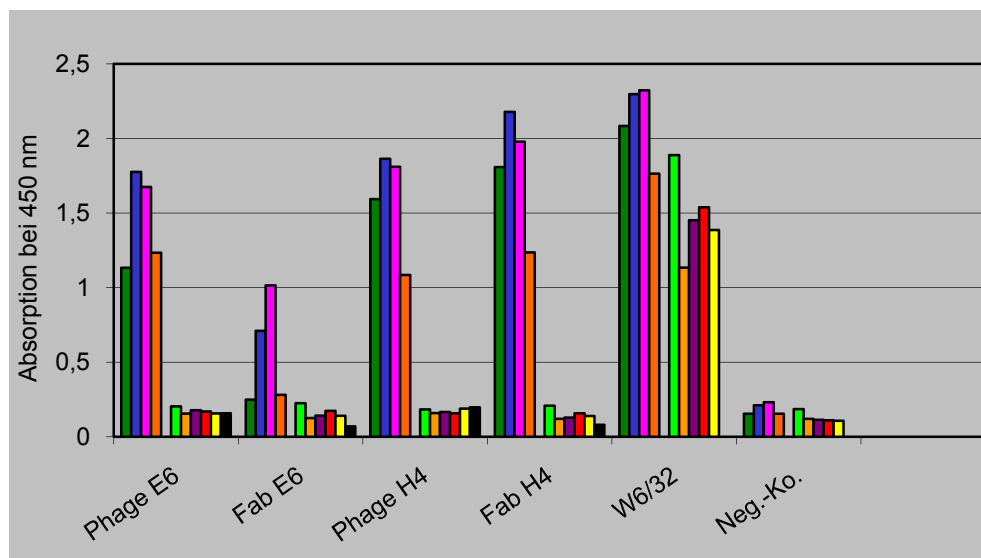


Abbildung 11: ELISA der Phagen und Fab-Antikörper der Klone E6 und H4 sowie der Positivkontrolle W 6/32

Es gilt folgende Farbcodierung: EAA/ HLA-A*0201 (dunkelgrün); ELA/ HLA-A*0201 (dunkelblau); AA/ HLA-A*0201 (rosa) LA/ HLA-A*0201 (orange); AL/ HLA-A*0201 (hellblau); SSX2₄₁₋₄₉/ HLA-A*0201 (hellgrün); G250-GLA/ HLA-A*0201 (ockergelb); G250-GLL/ HLA-A*0201 (violett); G250-HLA/ HLA-A*0201 (rot); CMV pp65/ HLA-A*0201 (gelb); Negativkontrolle: Phage bzw. Fab-Antikörper auf biotinyliertem BSA mit Streptavidin und sekundären Antikörpern (schwarz)

Die Ergebnisse des ELISA, dargestellt in Abbildung 11, bestätigen die vorab postulierte Spezifität, bezogen auf die getesteten MHC-Peptid-Komplexe, der Klone E6 und H4. Diese wurden für weitere Analysen herangezogen. Zusätzlich wurden die Analysen auch mit dem Klon A7 fortgeführt, da er sich als kreuzreaktiv nur gegen einige HLA-A*0201-präsentierte Peptide erwies.

2.3 *Bestimmung der spezifischen Reaktivität selektionierter Klone gegen native, auf Zellen präsentierte MHC-Peptid-Komplexe*

2.3.1 *Reaktivität auf T2-Zellen*

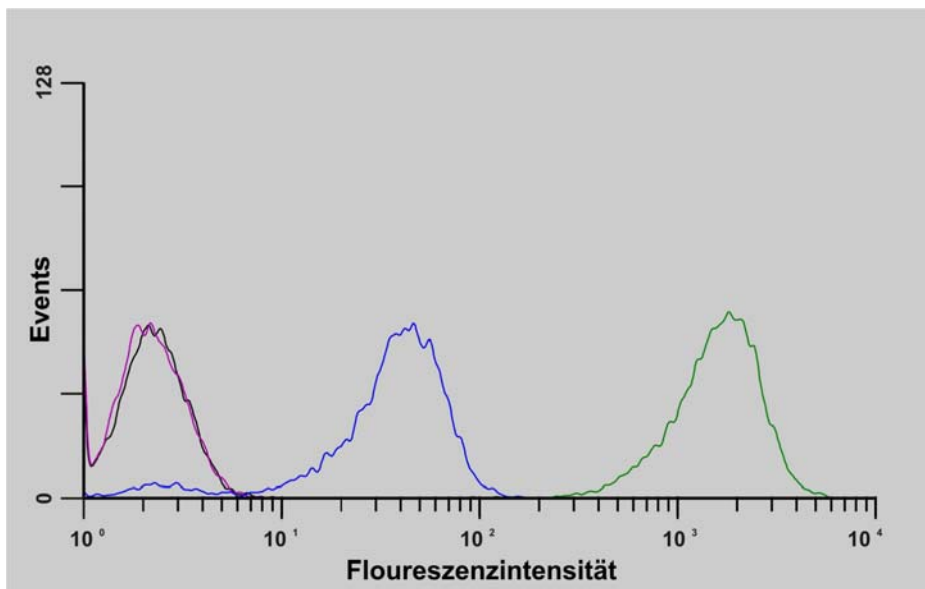
Nachdem aus den selektionierten Klonen die Klone A7, E6 und H4 für weitere Analysen ermittelt waren, wurden nun in einem ersten Schritt die Fab-Antikörper auf extern mit Peptiden beladenen T2-Zellen mittels Durchflusszytometrie getestet, um ihre

Bindungsfähigkeit mit nativen, auf Zellen präsentierten MHC-Peptid-Komplexen zu evaluieren.

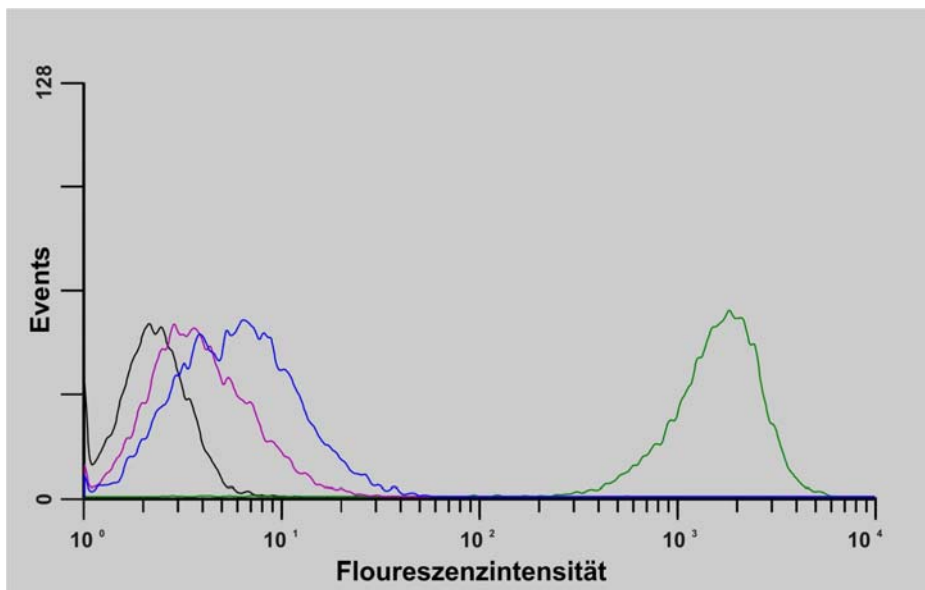
Als Erstes sollte die Frage beantwortet werden, ob die Fab-Antikörper der drei Klone mit nativen MHC-Peptid-Komplexen, wie sie auf der Oberfläche von Zellen präsentiert werden, zu interagieren vermögen. Dafür wurden T2-Zellen nur mit einem Peptid beladen, in diesem Fall mit Melan-A₂₆₋₃₅ ELA. Es wurde dieses Peptid gewählt, da hier die drei Klone im ELISA bei 450 nm relativ hohe Absorptionswerte zeigten.

Als Peptidkonzentration wurden 20 µg/ml, als Konzentration für die Fab-Antikörper wurde 50 µg/ml gewählt.

A)



B)



C)

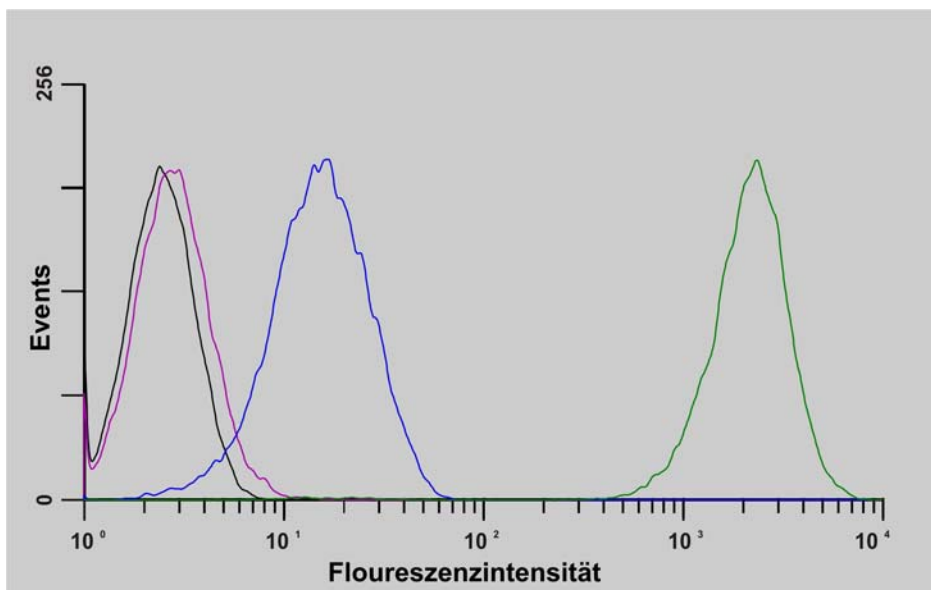


Abbildung 12: Durchflusszytometrie der drei Fab-Antikörper auf mit Melan-A₂₆₋₃₅ ELA beladenen T2-Zellen

A) E6; B) A7; C) H4

Für alle gilt folgende Farbcodierung: Schwarz: unbeladene T2-Zelle mit sekundären Antikörpern; Violett: unbeladene T2-Zelle mit Fab-Antikörper; Blau: mit Melan-A₂₆₋₃₅ ELA beladene T2-Zelle mit Fab-Antikörper; Grün: unbeladene T2-Zelle mit BB7.2

Die Abbildung 12 verdeutlicht, dass die Fab-Antikörper der Klone E6, A7 und H4 auf Zellen eine deutliche Änderung der Fluoreszenzintensität (FI) zeigen und somit davon ausgegangen werden kann, dass sie mit nativen, auf der Zelloberfläche präsentierten MHC-Peptid-Komplexen interagieren. Bei Klon A7 fällt, verglichen mit den beiden anderen Klonen, auf, dass der Fab-Antikörper bereits auf der unbeladenen Zelle eine FI-Änderung zeigt.

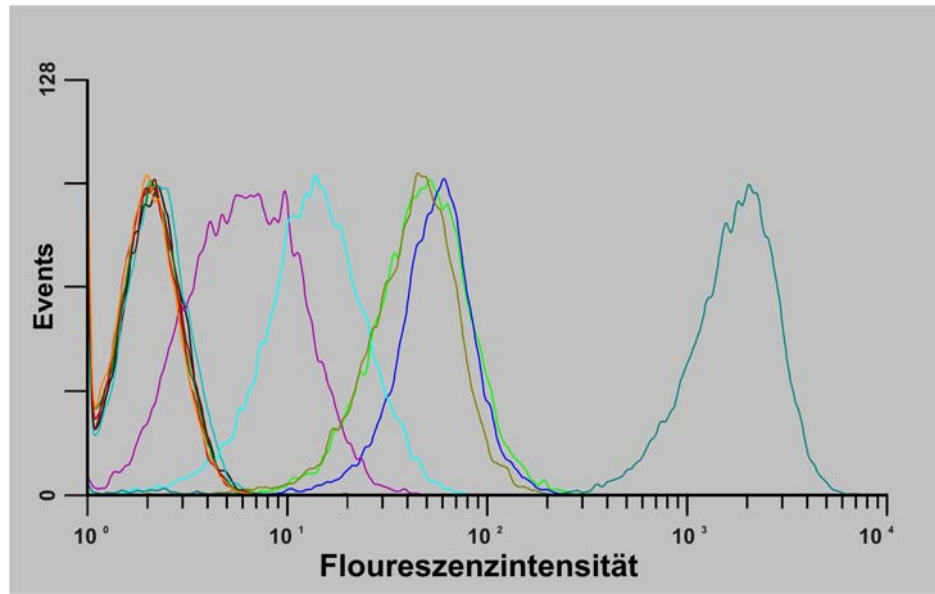
Nachdem die Fähigkeit, auf nativen MHC-Peptid-Komplexen zu binden, an T2-Zellen gezeigt wurde, erfolgten in einem nächsten Schritt Analysen bezüglich der Spezifität der Klone auf T2-Zellen. Hierfür wurden diese mit einem Panel an HLA-A*0201-restringierten Peptiden von extern beladen und mit den entsprechenden Fab-Antikörpern gefärbt.

Es kamen folgende HLA-A*0201-restringierte Peptide zur Anwendung:

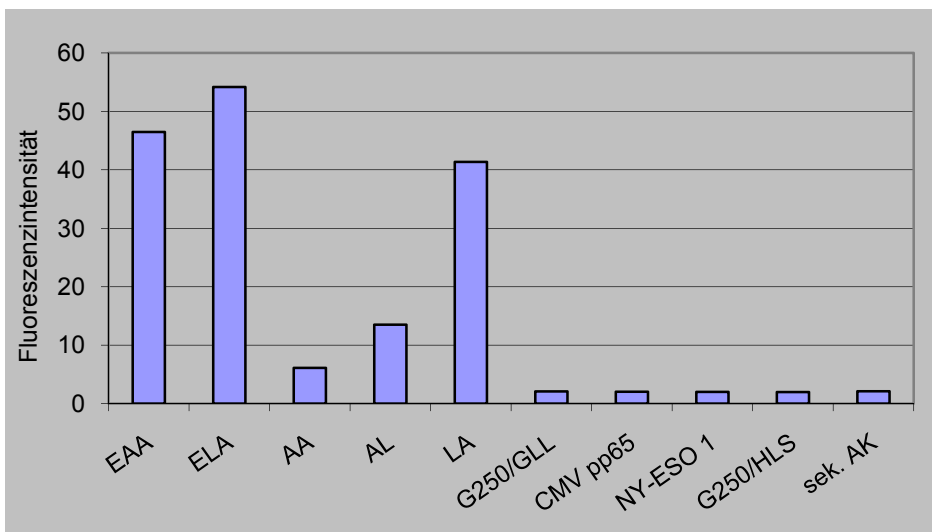
- Melan-A₂₆₋₃₅ EAA
- Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA
- Melan-A₂₇₋₃₅ AA
- Melan-A₂₇₋₃₅ A27L LA

- Melan-A₂₇₋₃₅ A28L AL
- G250₄₂₁₋₄₂₉ GLL
- CMV₄₉₅₋₅₀₃pp65
- NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅
- G250₂₅₄₋₂₆₂ HLS

A)

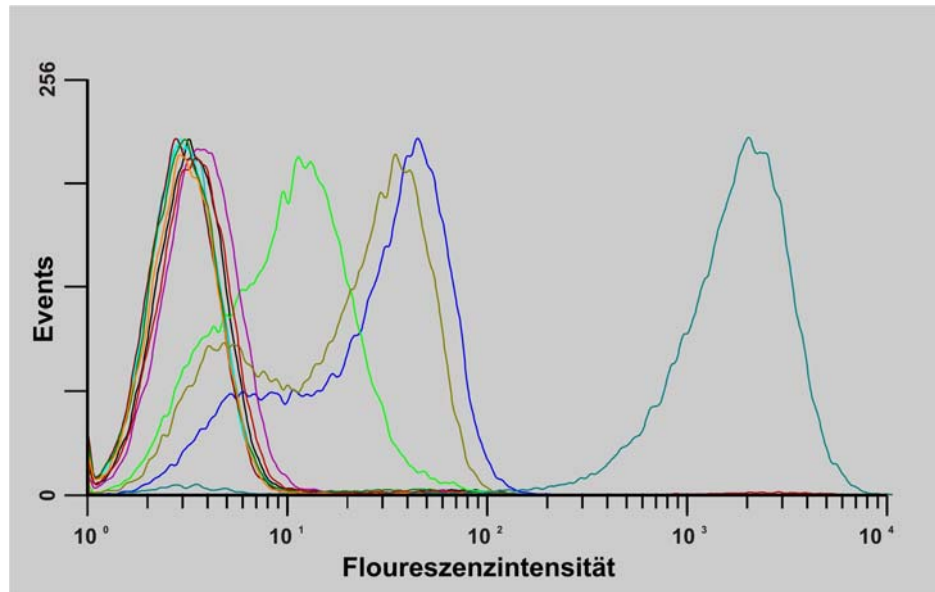


B)

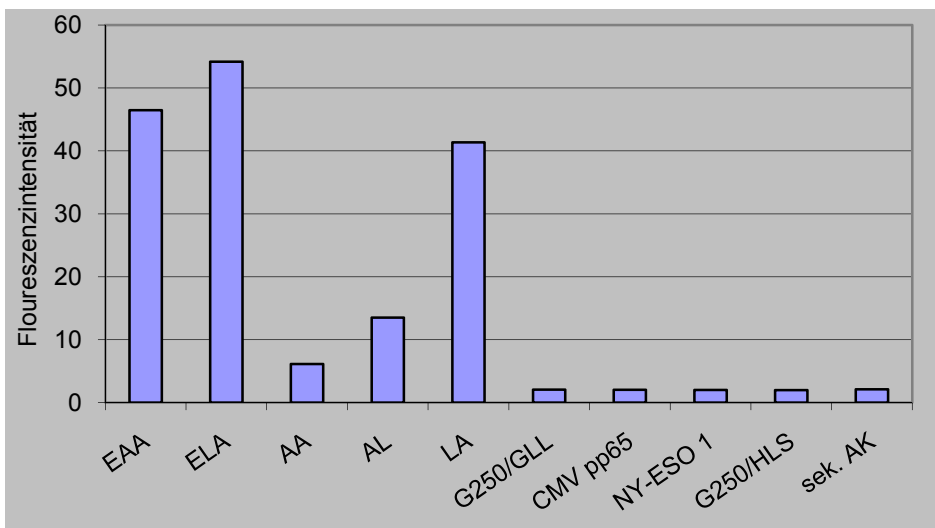


Abbildungen 13: Durchflusszytometrie des Fab-Antikörpers E6 auf T2-Zellen, beladen mit einem Panel an Peptiden, Darstellung als Histogramm A) und als Balkendiagramm B). Für A) gilt folgende Farbcodierung: Melan-A₂₆₋₃₅ EAA (hellgrün); Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA (dunkelblau); Melan-A₂₇₋₃₅ AA (violett); Melan-A₂₇₋₃₅ A27L LA (ockergelb); Melan-A₂₇₋₃₅ A28L AL (hellblau); G250₄₂₁₋₄₂₉ GLL (braun); CMV₄₉₅₋₅₀₃ pp65 (dunkelgrün); NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅ (rot); G250₂₅₄₋₂₆₂ HLS (orange)

A)

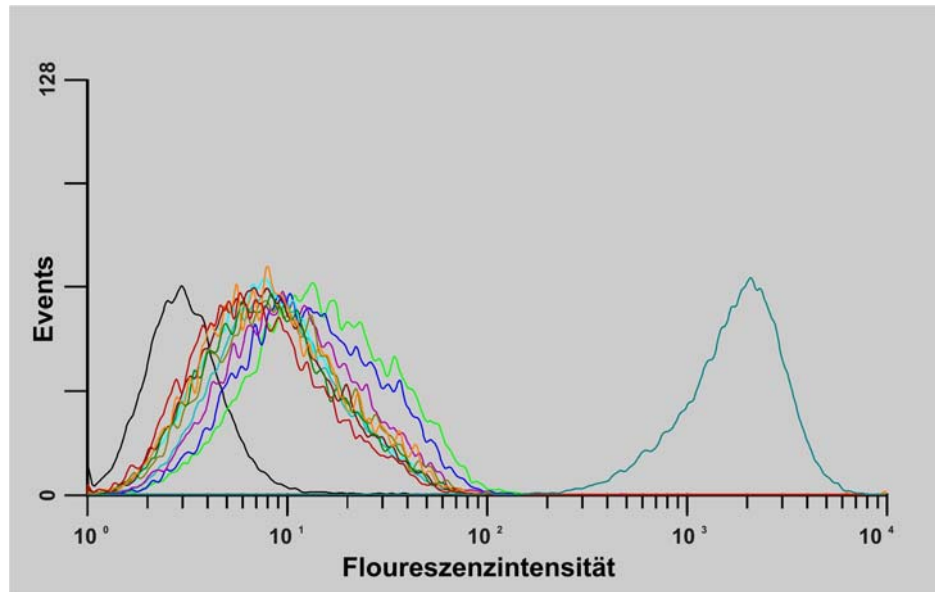


B)

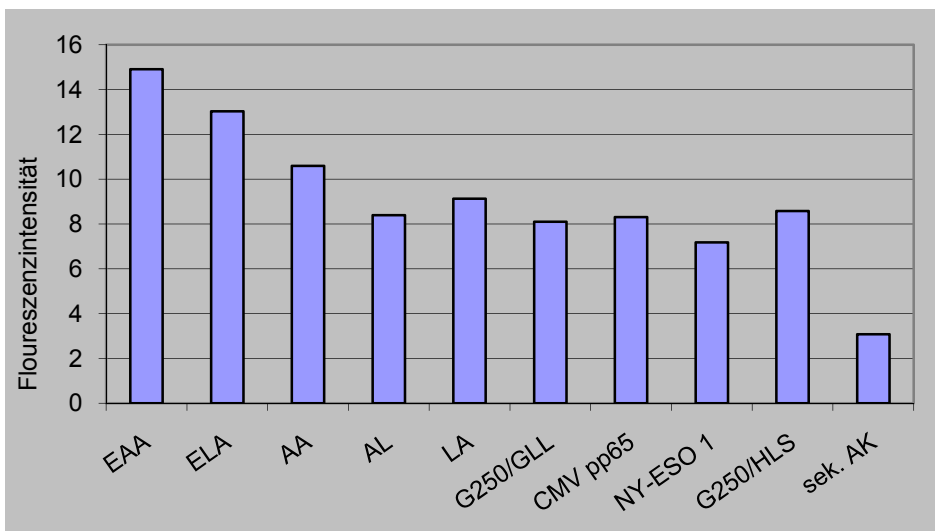


Abbildungen 14: Durchflusszytometrie des Fab-Antikörpers H4 auf T2-Zellen, beladen mit einem Panel an Peptiden, Darstellung als Histogramm A) und als Balkendiagramm B). Für A) gilt folgende Farbcodierung: Melan-A₂₆₋₃₅ EAA (hellgrün); Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA (dunkelblau); Melan-A₂₇₋₃₅ AA (violett); Melan-A₂₇₋₃₅ A27L LA (ockergelb); Melan-A₂₇₋₃₅ A28L AL (hell-blau); G250₄₂₁₋₄₂₉ GLL (braun); CMV₄₉₅₋₅₀₃ pp65 (dunkelgrün); NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₃ (rot); G250₂₅₄₋₂₆₂ HLS (orange)

A)



B)



Abbildungen 15: Durchflusszytometrie des Fab-Antikörpers A7 auf T2-Zellen, beladen mit einem Panel an Peptiden, Darstellung als Histogramm A) und als Balkendiagramm B). Für A) gilt folgende Farbcodierung: Melan-A₂₆₋₃₅ EAA (hellgrün); Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA (dunkelblau); Melan-A₂₇₋₃₅ AA (violett); Melan-A₂₇₋₃₅ A27L LA (ockergelb); Melan-A₂₇₋₃₅ A28L AL (hellblau); G250₄₂₁₋₄₂₉ GLL (braun); CMV₄₉₅₋₅₀₃ pp65 (dunkelgrün); NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₃ (rot); G250₂₅₄₋₂₆₂ HLS (orange)

Die Abbildungen 13-15 bestätigten die Ergebnisse der Fab-Antikörper der Klone E6 und H4 des ELISA. Ferner zeigte, dass die beiden Fab-Antikörper E6 und H4 sich in der Durchflusszytometrie nur mit T2-Zellen interagierten, die die relevanten Melan-A-Peptide im Kontext des HLA-A*0201 Komplex präsentierten. Ebenso bestätigte im Fall des Fab-Antikörpers A7 das vorherige ELISA-Ergebnis: Er zeigte auf allen getesteten Kontrollen eine FI-Änderung und interagierte somit nicht peptid-spezifisch mit dem MHC-Komplex. Im weiteren Verlauf der Arbeit fand dieser Klon keine weitere Berücksichtigung mehr.

2.3.2 *Reaktivität auf EBV-immortalisierten B-Zellen*

Nachdem sich die Klone E6 und H4 auf T2-Zellen als MHC-Peptid-spezifisch erwiesen, erfolgten in einem nächsten Schritt durchflusszytometrische Analysen auf weiteren Zelllinien: auf EBV-immortalisierten B-Zellen humaner Spender.

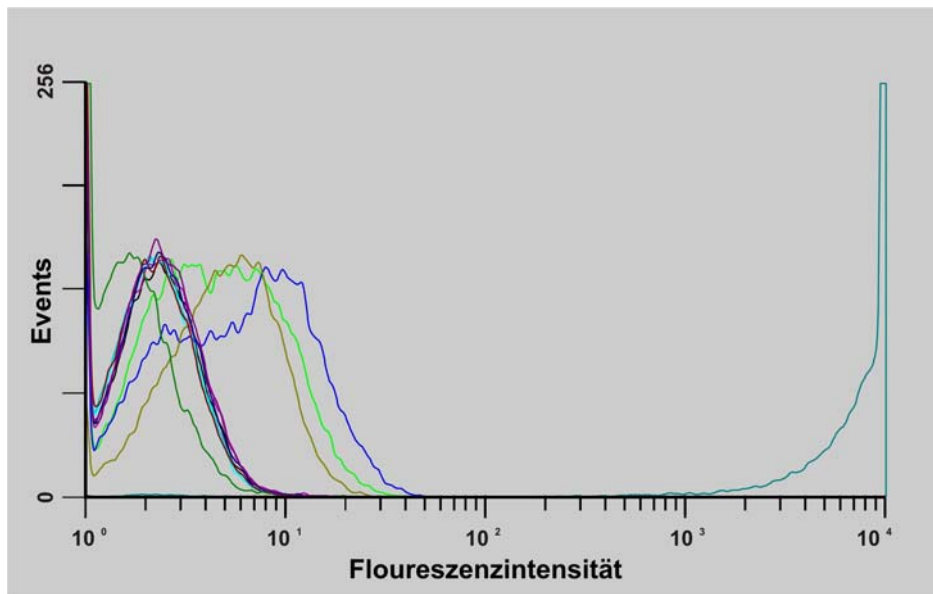
Diese lymphoblastoide Zelllinie entsteht durch Infektion und Immortalisierung primärer humaner B-Zellen durch das Epstein-Barr-Virus *in vitro*. Diese EBV-Transformation stellt die einfachste Möglichkeit dar, eine permanente Zelllinie aus einem gesunden Spender herzustellen, wobei das EBV in den Zellen vorwiegend im Latenzzustand III mit Expression sämtlicher latenter Proteine, vorliegt.

In diesem Fall wurden, jeweils aus humanen B-Zellen gesunder Spender generiert, zwei Zelllinien EBV-immortalisierter B-Zellen benötigt: Als „Positivlinie“ eine Linie, welche HLA-A*0201 exprimiert sowie als „Negativlinie“ eine Linie ohne den HLA-A*0201-Komplex. Beide Zelllinien wurden jeweils von extern mit Peptiden beladen und anschließend mit den Fab-Antikörpern der Klone E6 und H4 gefärbt.

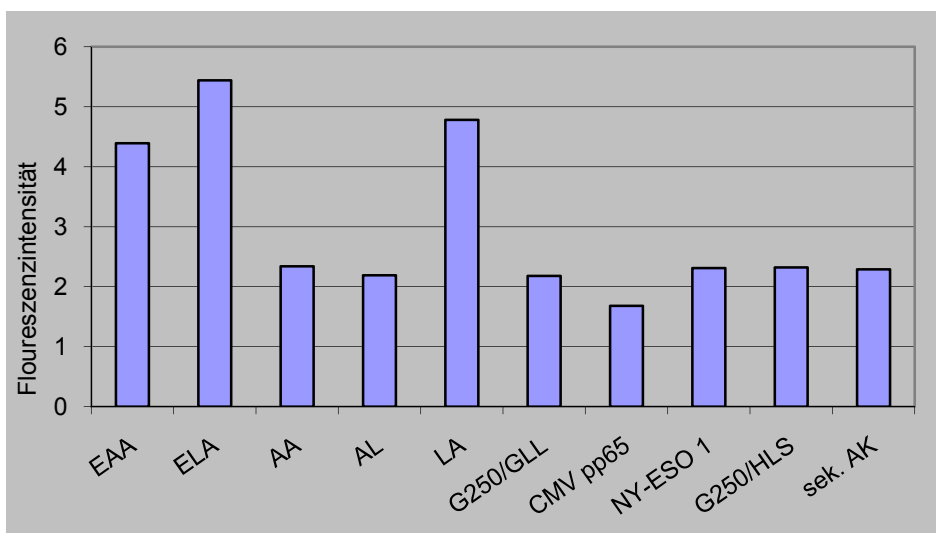
2.3.2.1 *HLA*A-0201 positive EBV-immortalisierte B-Zellen*

Um die bisherigen Ergebnisse mit T2-Zellen zu bestätigen und auszuschließen, dass es bei den 2.3.1 gemachten Beobachtungen um ein ausschließlich auf T2-Zellen zu beobachtendes Phänomen handelte, führten wir weitere durchflusszytometrische Analysen mit weiteren Antigen-präsentierenden Zellen durch. Dadurch sollte bewiesen werden, dass die Interaktion der Fab-Antikörper mit dem MHC-Komplex Peptid-spezifisch und auf das HLA-A*0201 Allel beschränkt war. Als Zellen wurden EBV-immortalisierte B-Zellen verwendet, die mit dem identischen Panel an Peptiden beladen wurden wie in vorherigen Experimenten die T2-Zellen.

A)



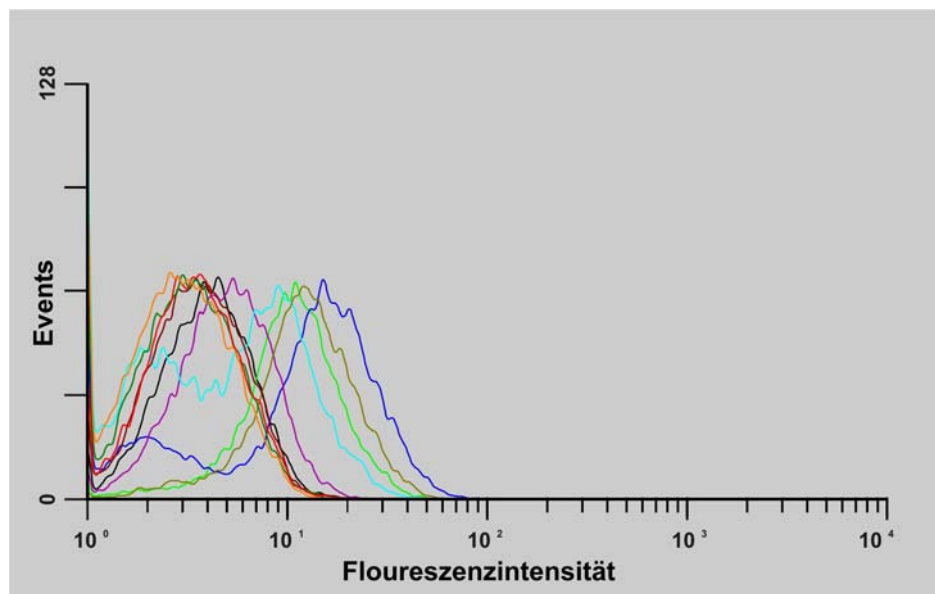
B)



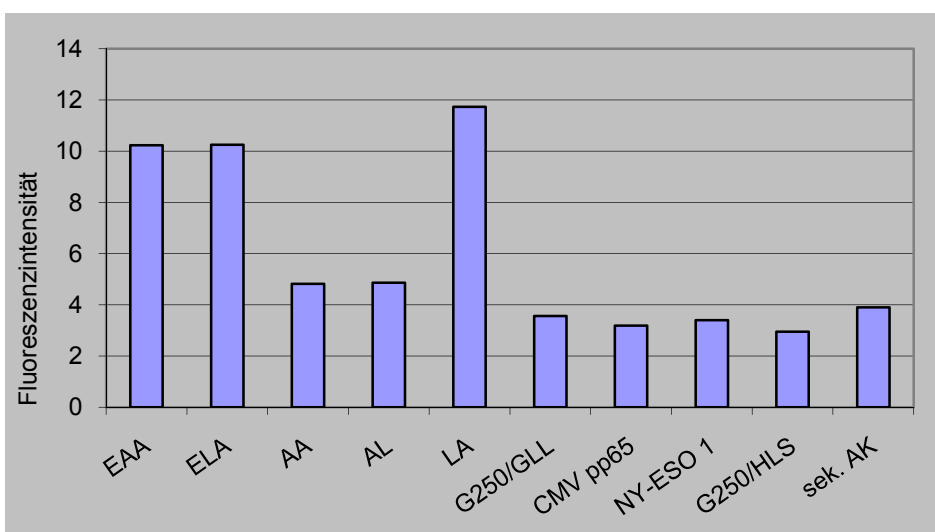
Abbildungen 16: Durchflusszytometrie des Fab-Antikörpers H4 auf EBV-immortalisierten B-Zellen, beladen mit einem Panel an Peptiden, Darstellung als Histogramm A) und als Balkendiagramm B).

Für A) gilt folgende Farbcodierung: Melan-A₂₆₋₃₅ EAA (hellgrün); Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA (dunkelblau); Melan-A₂₇₋₃₅ AA (violett); Melan-A₂₇₋₃₅ A27L LA (ockergelb); Melan-A₂₇₋₃₅ A28L AL (hellblau); G250₄₂₁₋₄₂₉ GLL (braun); CMV₄₉₅₋₅₀₃ pp65 (dunkelgrün); NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅ (rot); G250₂₅₄₋₂₆₂ HLS (orange)

A)



B)



Abbildungen 17: Durchflusszytometrie des Fab-Antikörpers E6 auf EBV-immortalisierten B-Zellen, beladen mit einem Panel an Peptiden, Darstellung als Histogramm A) und als Balkendiagramm B).

Für A) gilt folgende Farbcodierung: Melan-A₂₆₋₃₅ EAA (hellgrün); Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA (dunkelblau); Melan-A₂₇₋₃₅ AA (violett); Melan-A₂₇₋₃₅ A27L LA (ockergelb); Melan-A₂₇₋₃₅ A28L AL (hellblau); G250₄₂₁₋₄₂₉ GLL (braun); CMV₄₉₅₋₅₀₃ pp65 (dunkelgrün); NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅ (rot); G250₂₅₄₋₂₆₂ HLS (orange)

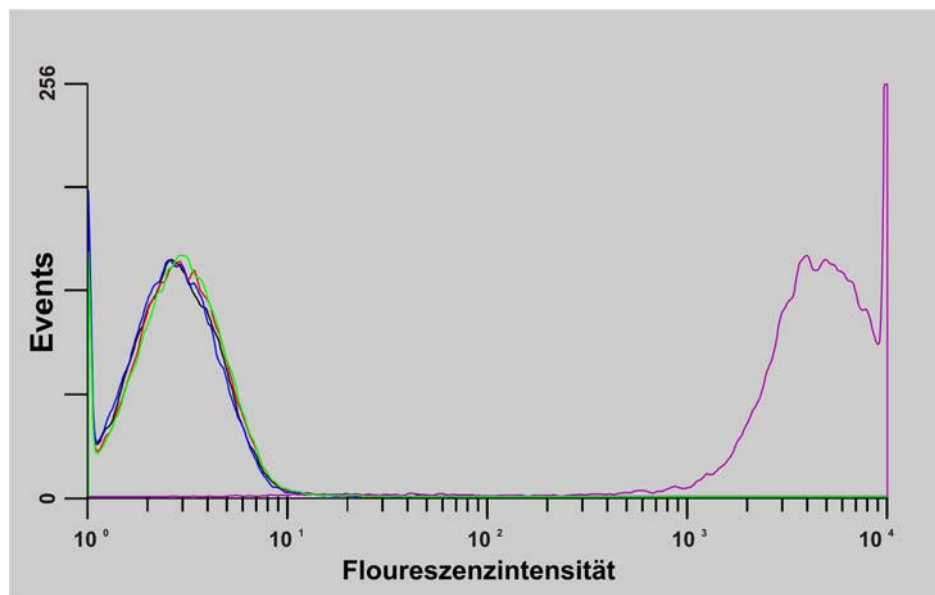
Die Spezifitätsanalysen auf EBV-immortalisierten B-Zellen konnten auch in dieser Versuchsreihe die Ergebnisse sowohl des ELISA als auch der Spezifitätsanalysen auf T2-Zellen bestätigen: Bei beiden Fab-Antikörpern konnte man einerseits einen Unterschied zwischen den FI-Werten der Melan-A-Peptiden und den Kontroll-Peptiden feststellen sowie des Weiteren FI-Werte der Kontrollpeptide nahe des der Negativkontrolle messen. Daraus ließ sich schließen, dass die Spezifität der Fab-Antikörper E6 und H4 kein rein auf T2-Zellen beobachtetes Phänomen darstellte.

Des Weiteren zeigte sich, dass die FI-Werte bei gleicher Konzentration der Peptide jeweils nach Färbung mit E6 höher waren als nach Färbung mit H4. Diese Tatsache wurde im weiteren Verlauf der Arbeit näher untersucht.

2.3.2.2 *HLA*A-0201 negative EBV-immortalisierte B-Zellen*

Diese HLA-A*0201-negativen EBV-immortalisierten B-Zellen wurden als “Negativlinie” verwendet. Die durchflusszytometrischen Analysen sollten zeigen, dass die Fab-Antikörper spezifisch sind für den HLA-A*0201-MHC-Peptid-Komplex. Dazu wurden die Zellen von extern mit den Peptiden Melan-A₂₆₋₃₅ EAA sowie mit Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA beladen und mit den Fab-Antikörpern gefärbt. Als Positivkontrolle diente hier der Anti-Human HLA-ABC Klasse I Antikörper W6/32.

A)



B)

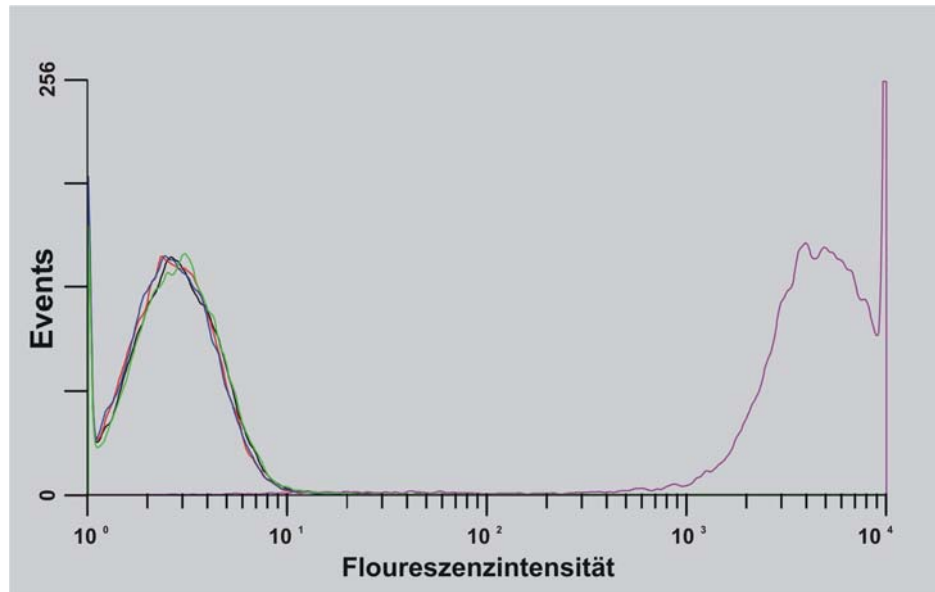


Abbildung 18: Durchflusszytometrie der beiden Fab-Antikörper auf EBV-immortalisierten HLA-A*0201-negativen B-Zellen, beladen mit Melan-A26-35 EAA und Melan-A26-35 A27L ELA
A) E6; B) H4

Für beide gilt folgende Farbcodierung: rot: EBV-immortalisierte B-Zellen beladen mit Melan-A₂₆₋₃₅ EAA; blau: EBV-immortalisierte B-Zellen beladen mit Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA; hellgrün: EBV-immortalisierte B-Zellen nicht beladen (Negativkontrolle); violett: EBV-immortalisierte B-Zellen nicht beladen, gefärbt mit W6/32 (Positivkontrolle)

Die Abbildung 18 bestätigte, bezogen auf die hier getestete Zelllinie EBV-immortalisierter B-Zellen, die Spezifität der Klone für HLA-A*0201-restringierte MHC-Peptid-Komplexe, was die fehlende FI- Änderung in der Durchflusszytometrie verdeutlichte.

2.4 CTL-Inhibition mittels IFN- γ -ELISA

Die folgende Versuchsreihe sollte die selektionierten Fab-Antikörper hinsichtlich ihrer Fähigkeit, einen T-Zell-Rezeptor nachzuahmen, charakterisieren. Konnte ein Fab-Antikörper einen MHC-Peptid-Komplex an gleicher Stelle wie der jeweilige, für diesem MHC-Peptid-Komplex spezifische, T-Zell-Rezeptor binden, so sollte auf diese Weise die Reaktivität einer zytotoxischen T-Zelle inhibiert werden, es folglich nicht zu einer Aktivierung der T-Zellen kommen.

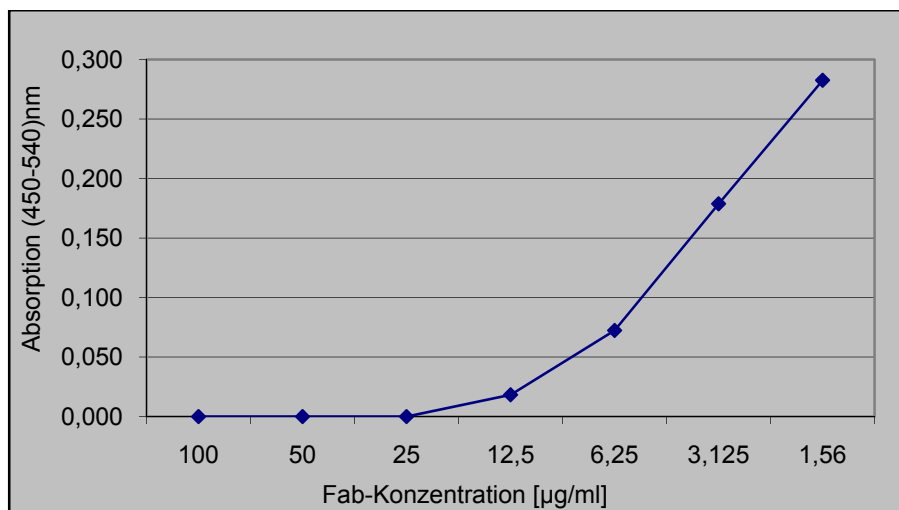
Zur Anwendung kam für diese Fragestellung ein IFN- γ ELISA. Bei einer Inhibition durch den Fab-Antikörper sollte die IFN- γ -Ausschüttung durch die zytotoxische T-

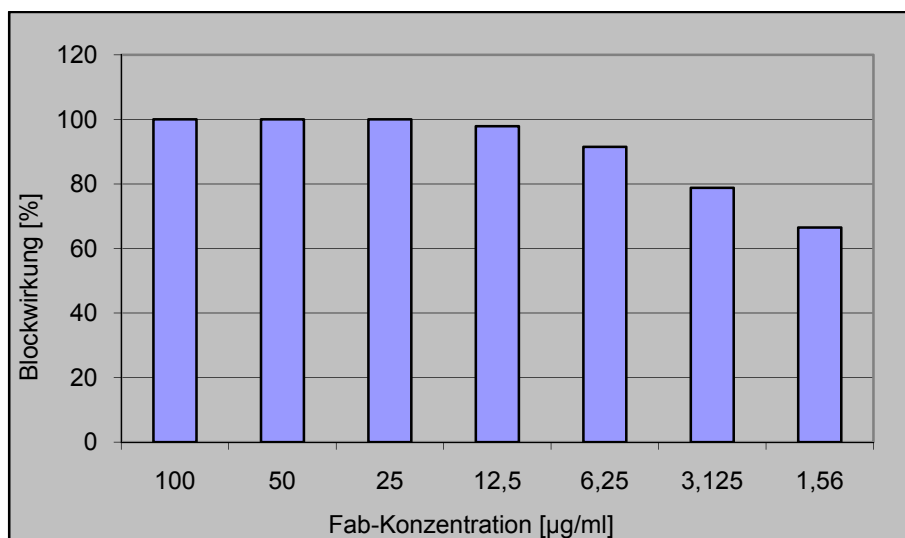
Zelle weitaus geringer sein verglichen mit der Reaktivität gegen einen „nativen“ MHC-Peptid-Komplex.

Als APC kamen in diesem Fall zwei Zelllinien zur Anwendung: Als „Positivlinie“ die HLA-A*0201- und Melan-A-positive Tumorzelllinie Sk-Mel-23 sowie als „Negativlinie“ die HLA-A*0201-positive und Melan-A-negative Tumorzelllinie Sk-Mel-37. Die „Positivlinie“ wurde zusätzlich von extern mit Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA beladen.

Die zytotoxischen T-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Frank Neumann, Onkologisches Labor der Inneren Medizin I, zur Verfügung gestellt. Sie entstammten einem gegen Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA selektierten T-Zell-Klon, dessen spezifische Reaktivität im Vorfeld der Analysen mehrfach nachgewiesen werden konnte.

In dieser Versuchsreihe wurde eine Peptidkonzentration von 0,5 µg/ml gewählt, die Zahl an zytotoxischen T-Zellen betrug 500 Zellen pro Probe, die Zahl an antigenpräsentierenden Sk-Mel-23 $3 \cdot 10^4$ Zellen pro Probe. Im Folgenden sind die Ergebnisse des Fab-Antikörpers H4 dargestellt:





Abbildungen 19: IFN- γ ELISA auf Sk-Mel-23 mit dem Fab-Antikörper H4; Darstellung der absorptionswerte (oben) sowie der Blockwirkung des Fab-Antikörpers (unten).

Es zeigte sich, dass mit dem Fab-Antikörper H4 in diesem Versuchsaufbau bis zur Fab-Konzentration von 25 µg/ml eine komplette Blockade der T-Zell-Reaktivität, gemessen an der IFN- γ -Ausschüttung, erzielt werden konnte. Weiter zeigte sich, dass die Blockwirkung im Verlauf der Titration der Fab-Konzentration immer weiter abnimmt. Als Vergleichswert diente die Absorption und damit die IFN- γ -Ausschüttung nach Vorinkubation der antigenpräsentierenden Zellen mit einem Fab-Antikörper, der ELA/HLA-A*0201 nicht erkennt.

Mit dem Fab-Antikörper E6 konnte keine reproduzierbare Blockwirkung erzielt werden.

3 **Sensitivitätsanalysen**

Nachdem sowohl in durchflusszytometrischen Analysen als auch im ELISA für die Klone E6 und H4 eine Spezifität für Melan-A-Peptide im Kontext eines HLA-A*0201-Komplexes nachgewiesen wurde, sollte nun die Sensitivität der Fab-Antikörper der beiden Klone analysiert werden; im Speziellen sollte die Sensitivität bezogen auf Melan-A₂₆₋₃₅ EAA sowie Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA untersucht werden.

3.1 Titration der Fab-Antikörper im ELISA

In einem ersten Schritt sollte die Sensitivität der Fab-Antikörper der Melan-A spezifischen Klone E6 und H4 sowie des als unspezifisch bezeichneten Klonen A7 im ELISA untersucht werden. Als Antigene wurden rekombinante MHC-Peptid-Komplexe verwendet. Von den Fab-Antikörpern wurde eine Titrationsreihe mit verschiedenen Konzentrationen erstellt.

Im Folgenden sind die ELISA-Ergebnisse der Titrationsreihe drei Fab-Antikörper graphisch dargestellt:

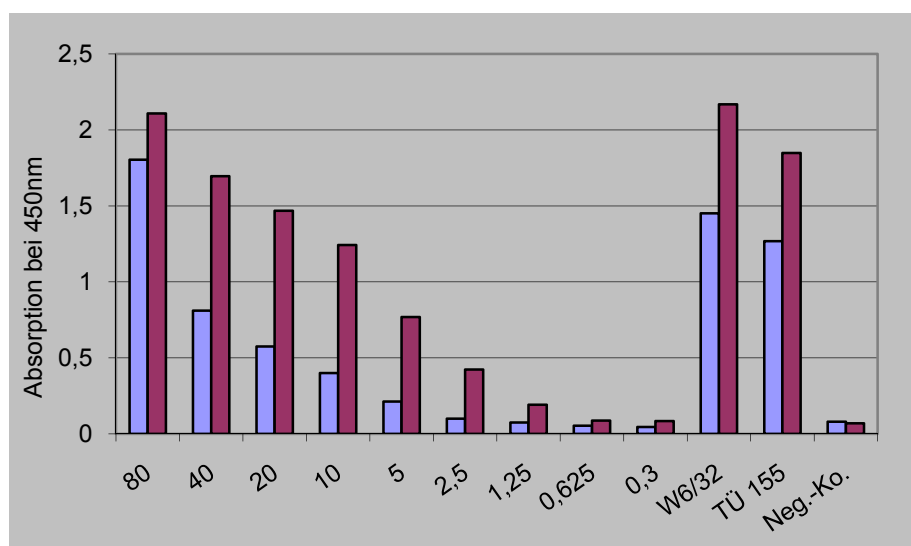


Abbildung 20: ELISA des Fab-Antikörpers E6 als Titrationsreihe auf ELA/HLA-A*0201 (violett) sowie EAA/HLA-A*0201(blau); W6/32 und Tü 155: Positivkontrolle

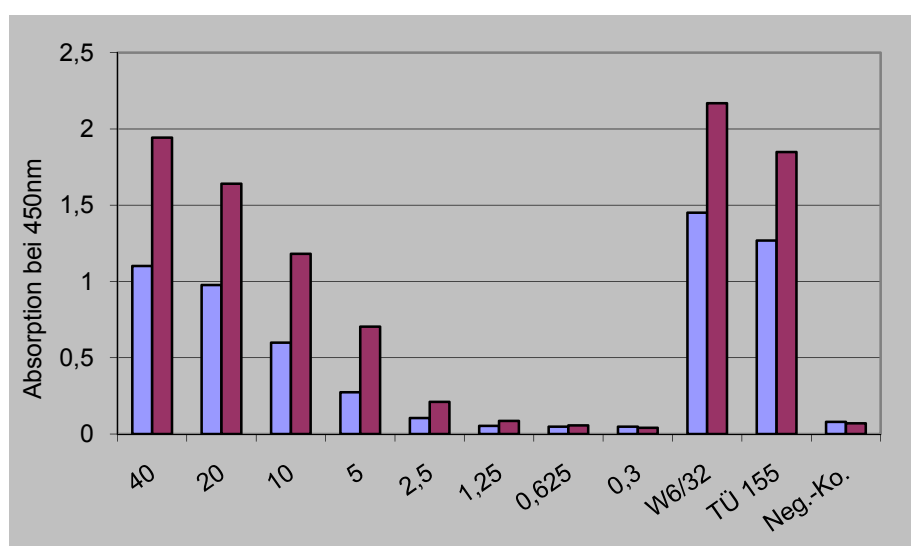


Abbildung 21: ELISA des Fab-Antikörpers H4 als Titrationsreihe auf ELA/HLA-A*0201 (violett) sowie EAA/HLA-A*0201(blau); W6/32 und Tü 155: Positivkontrolle

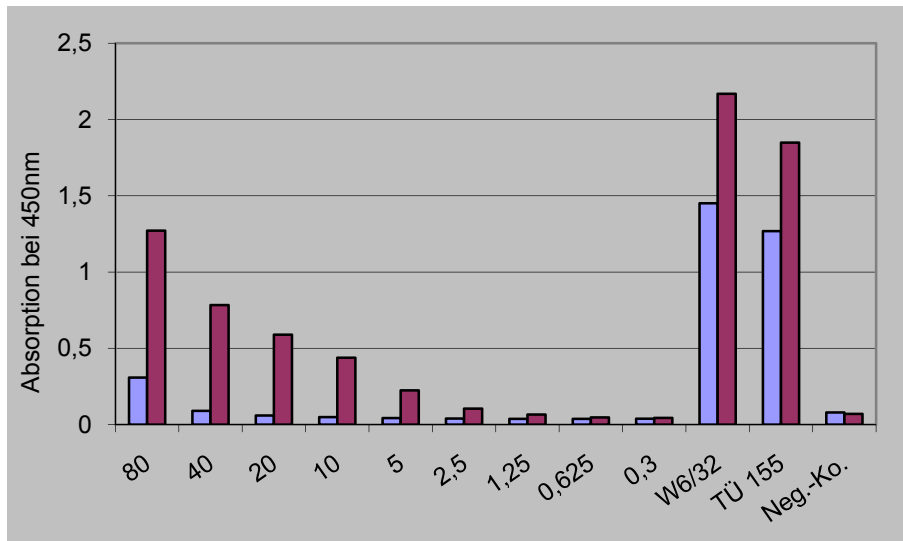


Abbildung 22: ELISA des Fab-Antikörpers A7 als Titrationsreihe auf ELA/HLA-A*0201 (violett) sowie EAA/HLA-A*0201 (blau); W6/32 und Tü 155: Positivkontrolle

Im Folgenden findet sich ferner eine graphische Gegenüberstellung der Absorptionswerte der drei Fab-Antikörper auf den beiden getesteten MHC-Peptid-Komplexen:

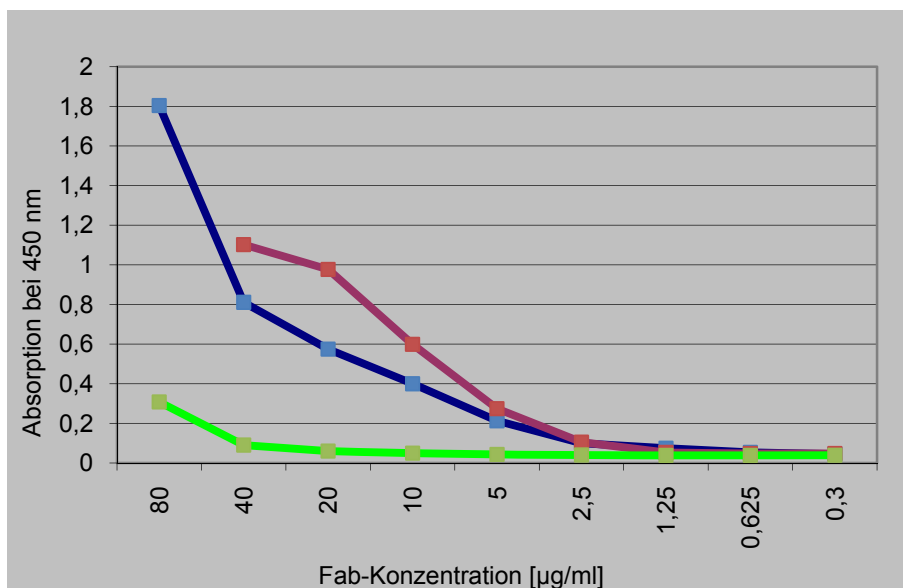


Abbildung 23: Gegenüberstellung der Absorptionswerte auf EAA/HLA-A*0201 der Fab-Antikörper E6 (blau), H4 (violett) und A7 (grün)

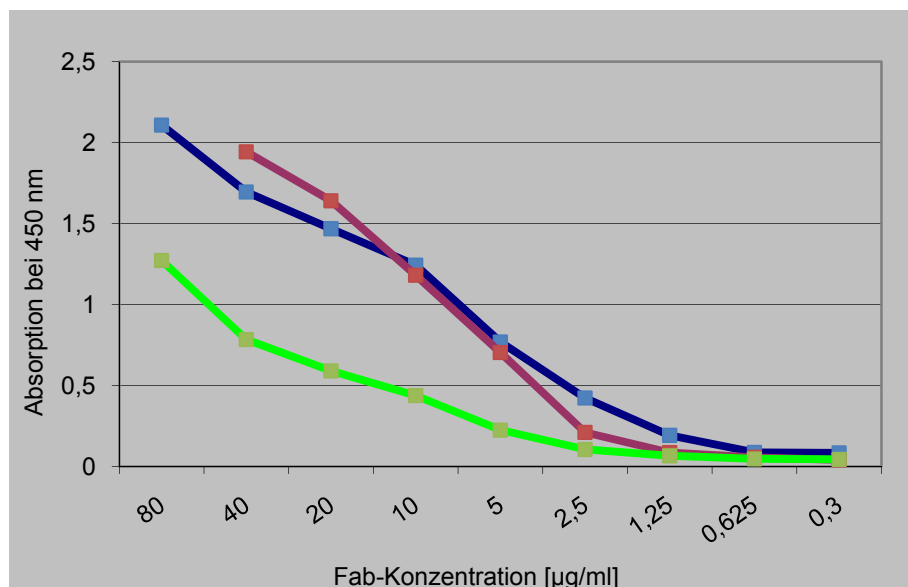


Abbildung 24: Gegenüberstellung der Absorptionswerte auf ELA/HLA-A*0201 der Fab-Antikörper E6 (blau), H4 (violett) und A7 (grün)

Die Absorptionswerte des ELISA lagen bei den Fab-Antikörpern aller drei Klone bei ELA/HLA-A*0201 höher als bei EAA/HLA-A*0201 als Peptid. Des Weiteren ließ sich bezüglich der Sensitivität der einzelnen Fab-Antikörper folgende Aussagen treffen: Die Sensitivität der Fab-Antikörper der beiden spezifischen Klone E6 und H4 lag deutlich höher als die des unspezifischen Klones A7. Dies war daran zu erkennen, dass sich mit dem Fab-Antikörper des Klons A7 auf EAA/HLA-A*0201 bereits bei einer Konzentration von 20 µg/ml sowie auf den MHC-Peptid-Komplexen mit ELA bei 2,5 µg/ml keine signifikante Absorption mehr nachweisen ließ. Mit dem Fab-Antikörper des Klons E6 dagegen ließ sich noch bei der letzten Titrationsstufe eine signifikante Absorption nachweisen.

3.2 Klonierung einer BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion

Mit Hilfe der Phage-Display-Methode lassen sich aus einer Phagenbibliothek gegen nahezu jedes mögliche Antigen Fab-Antikörper selektionieren. Diese können dann, wie im aktuellen Fall geschehen, weiteren Charakterisierungsschritten, wie z.B. Sensitivitäts- und Spezifitätsanalysen, unterzogen werden. Generell muss man jedoch feststellen, dass die auf diese Weise selektionierten und exprimierten Fab-Antikörper

einerseits mit einer relativ langen Kaskade detektiert werden müssen, was sehr zeitintensiv ist. Daraus rührt der Wunsch nach einem einfachen Detektionsmechanismus, ohne dabei einen Funktions- oder Affinitätsverlust der Fab-Antikörper in Kauf nehmen zu müssen.

Eine erfolgversprechende Methode fundiert auf der außerordentlich hohen Affinität zwischen Biotin und Streptavidin ($K_d=10^{-15}$ M) (Wilchek & Bayer, 1990). Diese Interaktion wird bereits eingehend verwendet, um beispielsweise aus diversen biotinylierten Liganden Tetramere zu erstellen. Eine Biotinylierung hat zwei Vorteile: Erstens können biotinylierte Fab-Antikörper mit geringem Aufwand detektiert werden und zweitens kommt es bei Tetramerbildung zu einer höheren Avidität und damit einhergehend zu einer Affinitätserhöhung.

Eine Biotinylierung der Fab-Antikörper kann nun auf zwei Wegen erfolgen:

- Biotinylierung der exprimierten löslichen Fab-Antikörper auf chemischem Weg
- Klonierung einer BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion

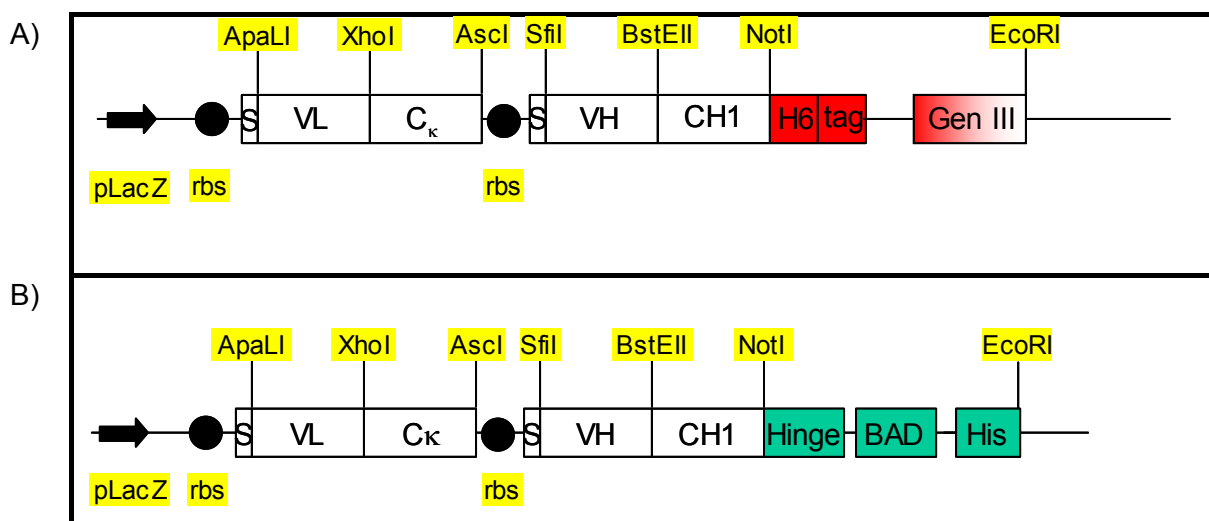
Die zuerst genannte Methode der chemischen Biotinylierung erfolgt in der Regel mittels NHS-SS-Biotin, einer Substanz, die in der Lage ist, Proteine mit primärer Aminogruppe, beispielsweise die Aminosäure Lysin oder endständige NH_2 -Gruppe, zu biotinylieren. Die Methode hat jedoch den Nachteil, dass es zu keiner gerichteten, spezifischen Biotinylierung kommt, sondern Lysinreste in Proteinen unspezifisch mit einem Biotin versehen werden. Es besteht dabei die Gefahr, dass durch die Biotinylierung ein funktionsuntüchtiges Produkt entsteht, beispielsweise wenn ein Antikörpermolekül an einer für die Bindung seines Antigens relevanten Stelle biotinyliert wird. Gleichzeitig kann es in der Folge zu einer veränderten Tertiär- oder Quartärstruktur des Proteins kommen, was ebenfalls seine Funktion beeinträchtigen kann (Hoyer-Hansen et al., 2000).

Die zweite mögliche Methode macht sich ein Enzym zu Nutze, welches ursprünglich in *E.coli* identifiziert wurde: Das BirA-Enzym, eine Biotin-Ligase. Dieses katalysiert in einer hochspezifischen Weise die Entstehung einer Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe des Biotin sowie der ϵ -Aminogruppe des Lysinrestes einer sogenannten „*biotin acceptor domain*“ (BAD); *in vivo* wird als einziges bekanntes Protein das sogenannte „*biotin carboxyl carrier protein*“ (BCCP) biotinyliert (Shenoy & Wood, 1988). Schatz et. al. (Schatz, 1993) konnten das BCCP auf eine für die Biotinylierung durch das BirA-Enzym spezifische Sequenz von insgesamt 15 Aminosäuren reduzieren.

Diese ist ausreichend, um im Sinne einer BAD das natürliche Substrat des Enzyms nachzuahmen und eine Biotinylierung zu ermöglichen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass es zu einer gerichteten, spezifischen Biotinylierung des Lysinrestes in der BAD kommt. Gleichzeitig wird garantiert, dass durch enzymatische Biotinylierung 85-95% der jeweiligen Proteine auch mit einem Biotin versehen werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass enzymatisch biotinylierte Proteine nach Bindung an Streptavidin eine gleichartige räumliche Ausrichtung erfahren und somit als ideales Antigen im ELISA Verwendung finden können (Ivanov et al., 1992).

Da es auf diese Weise bereits in den entsprechenden *E.coli* zu einer Produktion biotinylierter Fab-Antikörper kommt, kam diese Methode in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung.

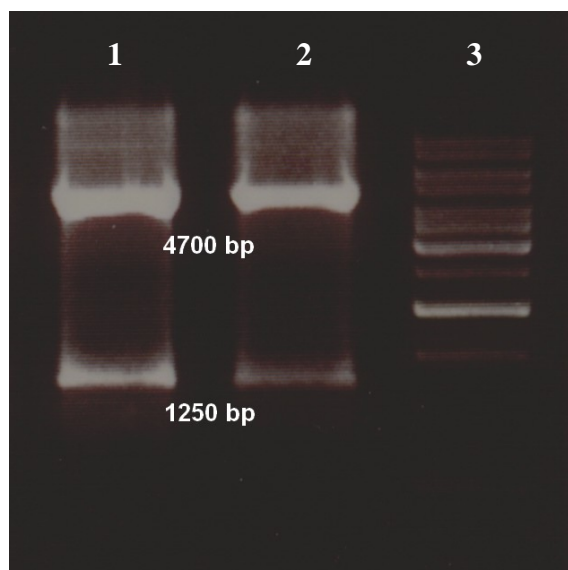
Es erfolgte die Klonierung einer BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion (BAD) im Vektor der beiden bereits ausgewählten und charakterisierten Fab-Antikörper E6 und H4. Der für diese Biotinylierungsregion codierende Vektor war der Phagemid-Vektor pCES1, dessen ursprüngliche Vektorkarte sowie die Neuentstandene im Folgenden dargestellt sind:



Abbildungen 25: Vektorkarte des Phagemid-Vektors pCES1 A) vor und B) nach Klonierung der BirA-enzymatischen Biotinylierungsregion.

Für beide gilt: pLacZ: LacZ-Promotor, über welchen die Expression der löslichen Fab-Antikörper gesteuert werden kann; S: Signalsequenz; Rbs: Ribosomenbindungsstelle (ribosome binding site); H6 oder His: Hexa-Histidin-Tag; Tag: c-myc-tag; Hinge: IgA-Hinge-Region; BAD: Biotin-Akzeptor-Domäne; His: Histidin-Schwanz; VL: variable Region der Leichtkette; C_κ: konstante Region der Leichtkette (in diesem Fall eine kappa-Kette); VH: variable Region der Schwereketten; CH1: konstante Region der Schwereketten; ApaLI, XhoI, AscI, SfiI, BstEII, NotI sowie EcoRI: Schnittstellen der jeweiligen Restriktionsenzyme

Der erste Schritt der Klonierung bestand in einem Restriktionsverdau der aus den *E.coli* isolierten Plasmide mittels EcoRI und XhoI. Das im Folgenden dargestellte

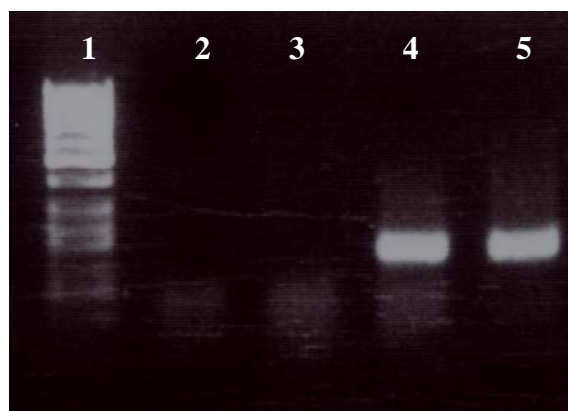


Agarosegel zeigte sowohl für den Klon E6 als auch für den Klon H4 die beiden Banden bei 4700 bp bzw. 1250 bp.

Die Bande bei 1250 bp entsprach dem aus dem pCES1-Vektor geschnittenen DNA-Fragment, welches für den His-Tag, den c-myc-tag sowie für das Protein III kodierte. Die Bande bei 4700 bp entsprach dem restlichen pCES1-Vektor.

Abbildung 26: Restriktionsverdau der Klone E6 (Bande 1) und H4 (Bande 2) mittels EcoRI und XhoI; Bande 3: Längenmarker

Der dann folgende zweite Schritt bestand in einer Ligation des BirA-Tag in den



pCES1-Vektor. Die Ligation wurde zunächst mittels einer PCR kontrolliert: Von den beiden verwendeten Primer konnte der 3'Primer „BirAtag EcoRI“ nur im Fall einer erfolgreichen Ligation binden.

Abbildung 27: Kontroll-PCR der Klone E6 (Bande 4) und H4 (Bande 5) auf pCES1 nach Ligation des BirA-Tag; Bande 1: Längenmarker; Bande 2 und 3: Negativkontrollen

Bei beiden Klonen E6 und H4 war im Agarose-Gel jeweils eine Bande sichtbar, was darauf schließen ließ, dass es zu einer Bindung des 3'Primers im neu klonierten BirA-Tag gekommen sein muss. Die Ligation war somit erfolgreich.

Nach Transformation des Plasmides in den *E.coli*-Stamm AVB101 und anschließender Produktion der löslichen biotinylierten Fab-Antikörper E6-b und H4-b wurde in einem letzten Schritt sicher gestellt, dass die Fab-Antikörper tatsächlich Biotin tragen und im SDS-Gel das für Fab-Antikörper charakteristische Bandenmuster zeigen. Da-

zu wurden zwei Westernblots durchgeführt, wobei sowohl E6-b als auch H4-b in reduzierender Form vorlagen. Im ersten Fall erfolgte eine Färbung mittels 9E10 sowie anti-Maus-POX, wodurch einzig die unbiotinylierten Fab-Antikörper mit noch vorhandenem c-myc-tag als Bande sichtbar wurden. Im zweiten Fall erfolgte die Färbung mittels Streptavidin-POX. Es stellten sich in diesem Fall nur die biotinylierten Fab-Antikörper als Bande dar, da sie kein c-myc-tag mehr beinhalteten, was das Vorhandensein von Biotin bewies.

Im Folgenden sind die beiden Westernblots dargestellt:

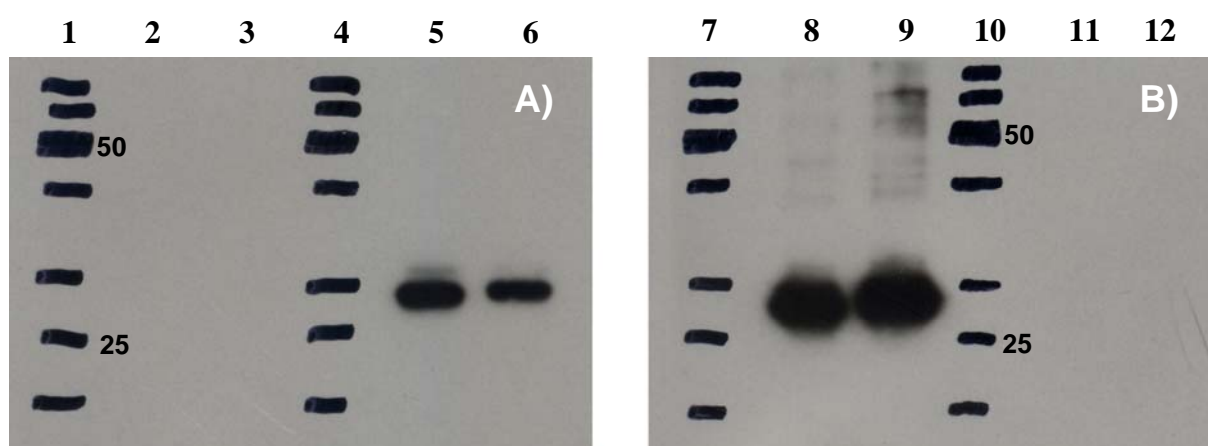


Abbildung 28: Westernblot mit den Fab-Antikörpern E6 bzw. E6-b sowie H4 bzw. H4-b, A) Färbung mit 9E10 und anti-Maus-POX sowie B) mit Streptavidin-POX
Es gilt: 1; 4; 7; 10: Längenmarker; 2+8: E6-b; 3+9: H4-b; 5+11: E6; 6+12: H4

In beiden Westernblots wurden die biotinylierten Fab-Antikörper jeweils in der rechten, die nicht biotinylierten Fab-Antikörper in der linken Spalte aufgetragen. Im linken Westernblot erfolgte die Färbung mit 9E10 und anti-Maus-POX, es stellten sich folglich nur die nicht biotinylierten Fab-Antikörper als Bande dar. Im rechten Westernblot erfolgte dagegen die Färbung mit Streptavidin-POX, es kamen nur die biotinylierten Fab-Antikörper als Bande zur Darstellung.

3.3 *Titration der Peptid-Präsentation auf Antigen-präsentierenden Zellen*

Nachdem bereits Sensitivitätsanalysen im ELISA durchgeführt worden waren, sollten nun zur weiteren Charakterisierung der Sensitivität der Klone E6 und H4 Analysen auf APCs erfolgen; dabei wurden als APCs T2-Zellen verwendet. Diese wurden mit einer Titrationsreihe der Peptide Melan-A₂₆₋₃₅ EAA sowie Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA be-laden und anschließend sowohl mit den biotinylierten als auch den unbiotinylierten Fab-Antikörpern der Klone E6 und H4 gefärbt.

Es wurden folgende Konzentrationen der Peptide verwendet:

- 20 µg/ml
- 5 µg/ml
- 1,25 µg/ml
- 0,31 µg/ml
- 0,078 µg/ml
- 0,039 µg/ml

Die Fab-Antikörper wurden in einer konstanten Konzentration von 20 µg/ml einge-setzt.

3.3.1 Durchflusszytometrische Analysen mit unbiotinylierten Fab-Antikörpern

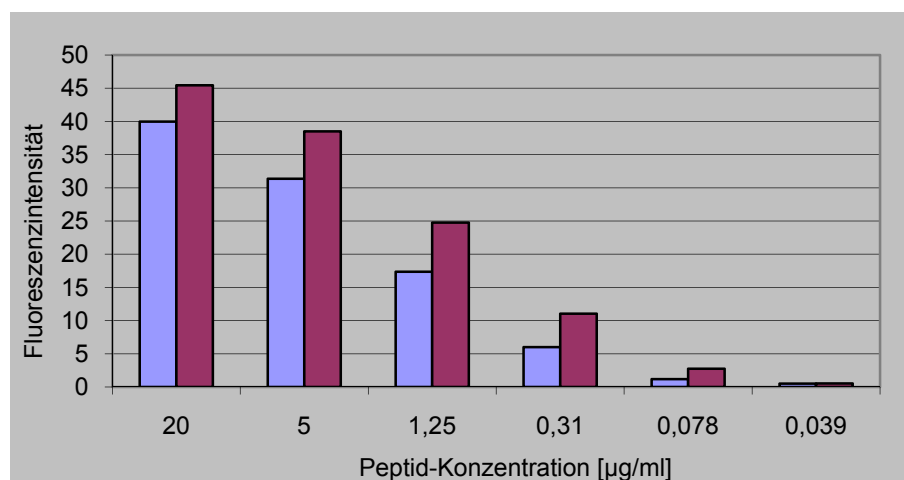


Abbildung 29: Durchflusszytometrie mit dem Fab-Antikörper E6 auf T2-Zellen, beladen mit Verdünnungsreihen der Peptide Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA (violett) sowie Melan-A₂₆₋₃₅ EAA (blau)

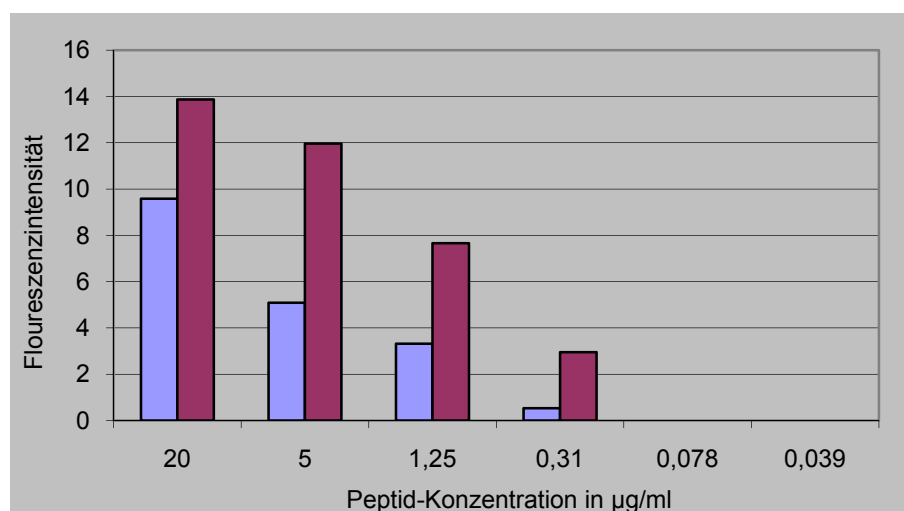


Abbildung 30: Durchflusszytometrie mit dem Fab-Antikörper H4 auf T2-Zellen, beladen mit Verdünnungsreihen der Peptide Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA (violett) sowie Melan-A₂₆₋₃₅ EAA (blau)

Die durchflusszytometrischen Analysen ließen folgende Aussagen bezüglich der Sensitivität der unbiotinylierten Fab-Antikörpern zu: Die Fab-Antikörper beider Klone zeigten auf den mit der Titrationsreihe von Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA beladenen T2-Zellen höhere FI-Werte als auf mit Melan-A₂₆₋₃₅ EAA beladenen T2-Zellen. Des Weiteren ließ sich nach Färbung mit dem Fab-Antikörper E6 noch bei der geringsten Peptid-Konzentration von 0,039 µg/ml eine Änderung der FI detektieren, wohingegen

es mit dem Fab-Antikörper H4 nur noch bei einer um den Faktor zehn höheren Konzentration möglich war.

3.3.2 Durchflusszytometrische Analysen mit biotinylierten Fab-Antikörpern

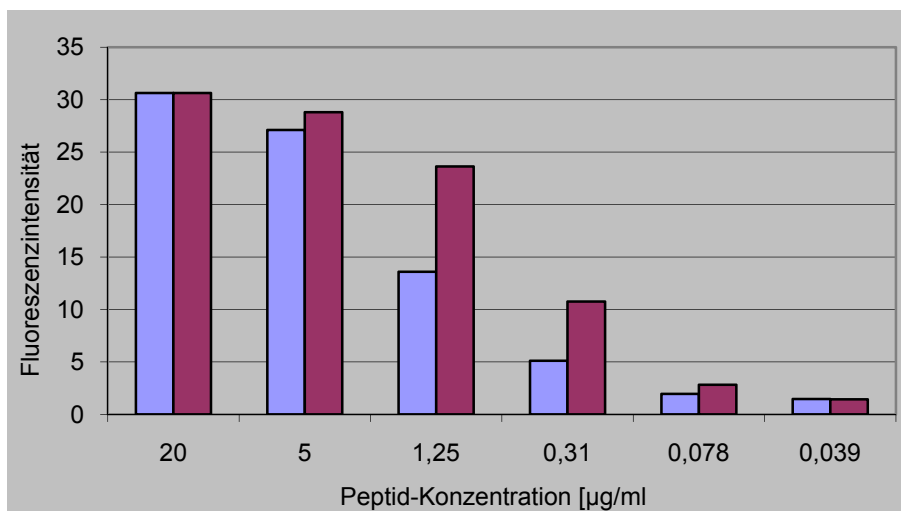


Abbildung 31: Durchflusszytometrie mit dem Fab-Antikörper E6-b auf T2-Zellen, beladen mit Verdünnungsreihen der Peptide Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA (violett) sowie Melan-A₂₆₋₃₅ EAA (blau)

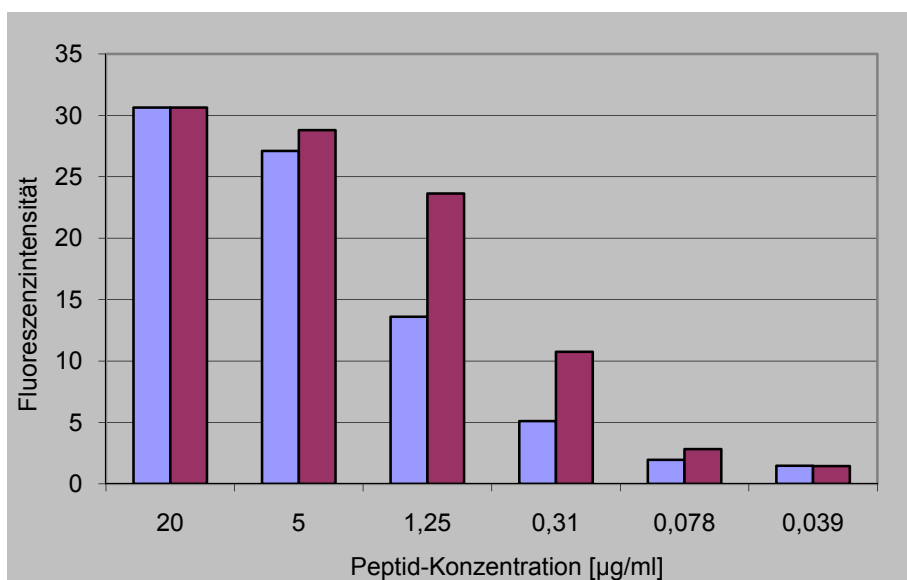


Abbildung 32: Durchflusszytometrie mit dem Fab-Antikörper H4-b auf T2-Zellen, beladen mit Verdünnungsreihen der Peptide Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA (violett) sowie Melan-A₂₆₋₃₅ EAA (blau)

Die durchflusszytometrischen Analysen mit den biotinylierten Fab-Antikörpern der Klone E6 und H4 bestätigten die Sensitivitätsanalysen mit den unbiotinylierten Fab-Antikörpern. Des Weiteren ließ sich mit dem Klon H4-b, im Gegensatz zum unbiotinylierten H4, noch bei der geringsten Peptid-Konzentration von 0,039 µg/ml eine FI-Änderung detektieren.

3.3.3 Vergleich zwischen biotinylierten und unbiotinylierten Fab-Antikörpern

Im Folgenden findet sich zu den beiden Peptiden Melan-A₂₆₋₃₅ EAA und Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA jeweils ein Vergleich der Reaktivität von biotinylierten und unbiotinylierten Fab-Antikörpern:

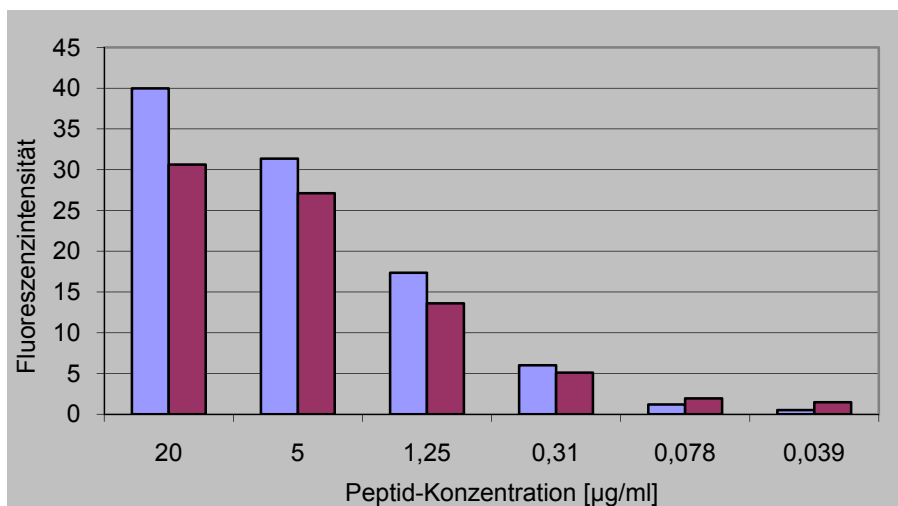


Abbildung 33: Vergleich der Fluoreszenzintensität der Fab-Antikörper E6 (blau) und E6-b (violett) auf einer Verdünnungsreihe von Melan-A₂₆₋₃₅ EAA

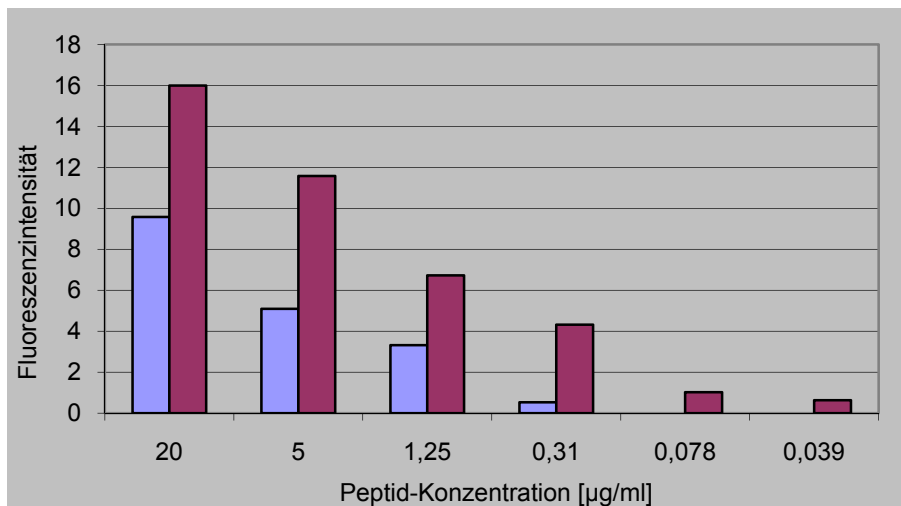


Abbildung 34: Vergleich der Fluoreszenzintensität der Fab-Antikörper H4 (blau) und H4-b (violett) auf einer Verdünnungsreihe von Melan-A₂₆₋₃₅ EAA

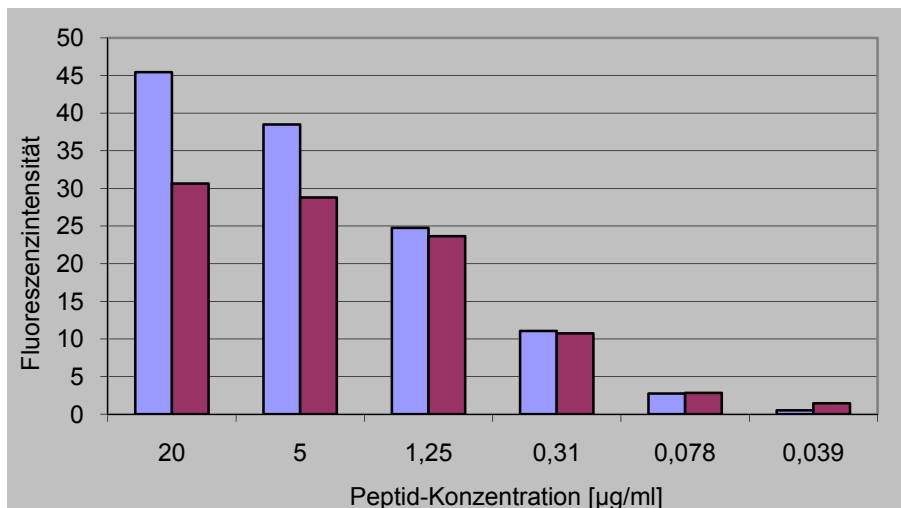


Abbildung 35: Vergleich der Fluoreszenzintensität der Fab-Antikörper E6 (blau) und E6-b (violett) auf einer Verdünnungsreihe von Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA

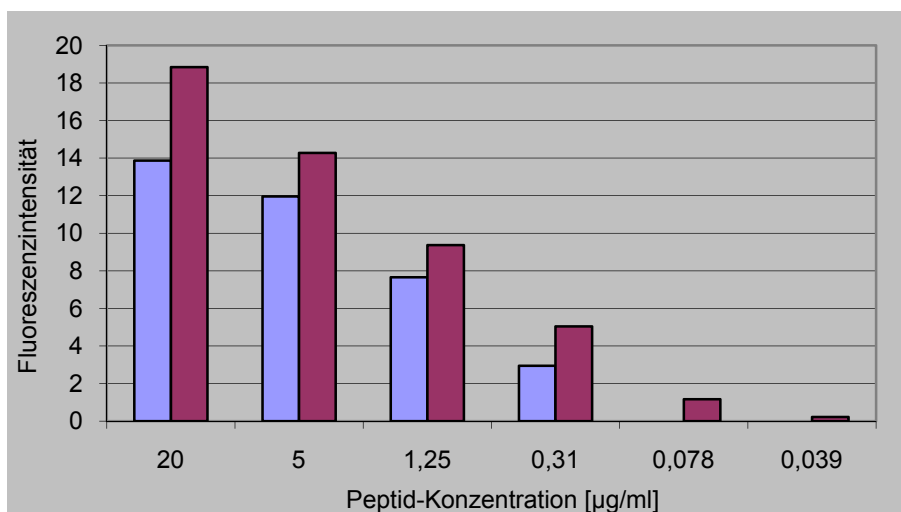


Abbildung 36: Vergleich der Fluoreszenzintensität der Fab-Antikörper H4 (blau) und H4-b (violett) auf einer Verdünnungsreihe von Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA

Der Vergleich der Fab-Antikörper H4 und H4-b verdeutlichte, dass sowohl auf den mit Melan-A₂₆₋₃₅ EAA als auch auf den mit Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA beladenen Zellen mit dem Fab-Antikörper H4-b die höheren FI-Werte erreicht werden konnten. Ganz im Gegensatz dazu erreichte der E6-b im Vergleich mit dem unbiotinylierten Fab-Antikörper E6 geringere FI-Werte auf beiden Peptiden.

4 *Detektion des MHC-Peptid-Komplexes nach endogener Prozessierung und Präsentation*

4.1 *Detektion des MHC-Peptid-Komplexes auf Tumorzellen*

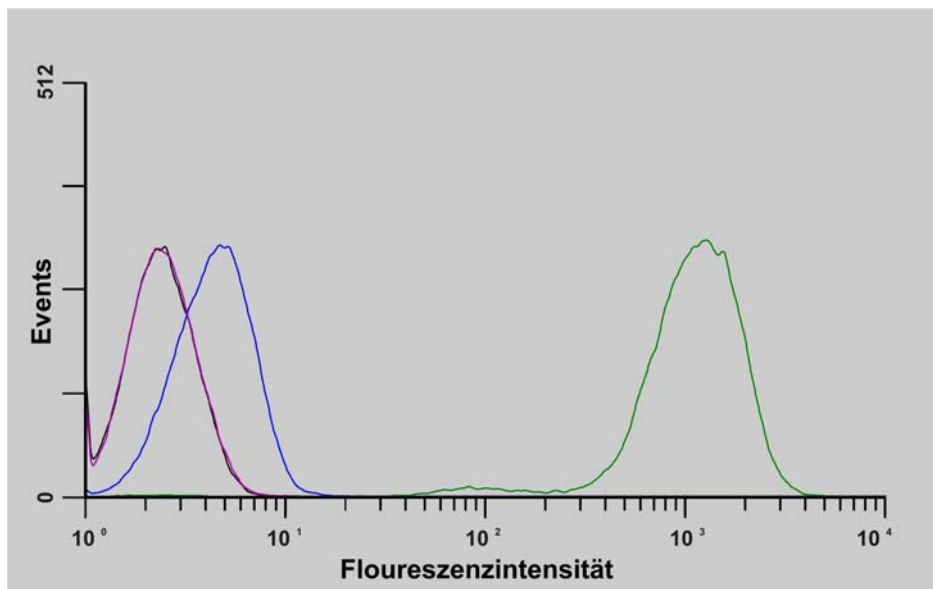
Als ein weiterer Aspekt der Arbeit sollte die Fähigkeit der Fab-Antikörper zur Detektion des MHC-Peptid-Komplexes nach endogener Prozessierung und Präsentation auf Tumorzellen untersucht werden. Dazu wurden in einem ersten Schritt für die Analysen in Frage kommende Tumorzelllinien ausgewählt. Dabei wurden sowohl „Positiv“- als auch „Negativlinien“ ausgewählt. Um als „Positivlinie“ Verwendung zu finden, muss eine Tumorzelllinie das Melan-A-Peptid in Kombination mit dem HLA-A*0201-Komplex auf der Zelloberfläche präsentieren. Dagegen galten als „Negativlinie“ solche Tumorzelllinien, welche HLA-A*0201-negativ und / oder Melan-A-negativ sind. Es wurden folgende Tumorzelllinien für die vorgesehenen Analysen ausgewählt:

- „Positivlinien“: Me 290, Me 275 sowie Sk-Mel-23
- „Negativlinien“: Me 260 (HLA-A*0201-negativ, Melan-A-positiv)
Sk-Mel-37 (HLA-A*0201-positiv, Melan-A-negativ)

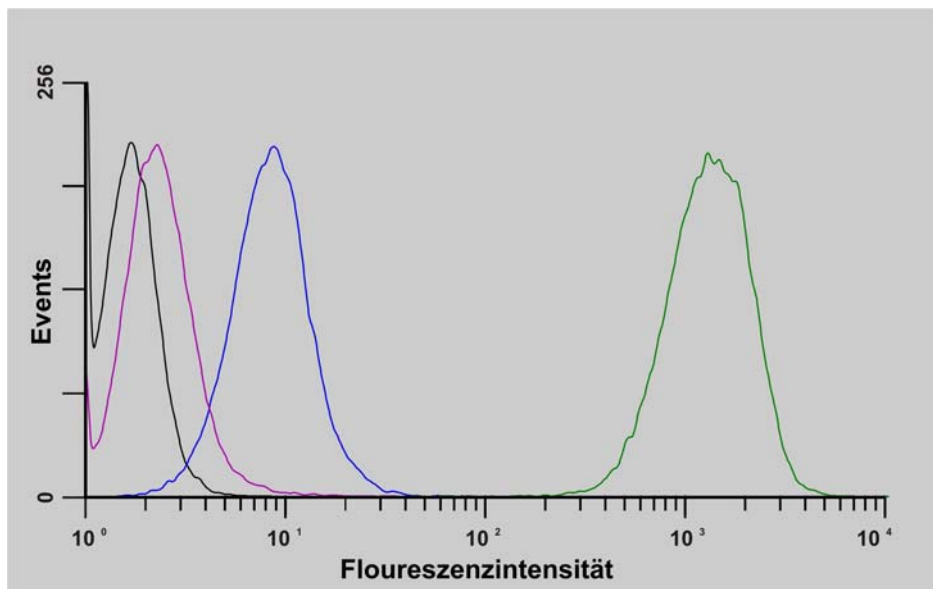
In einem nächsten Schritt erfolgten auf allen fünf Zelllinien durchflusszytometrische Analysen mit den unbiotinylierten Fab-Antikörpern der beiden Klone E6 und H4. Als Positivkontrolle auf den HLA-A*0201-positiven Tumorzelllinien wurde der anti-HLA-A2-Antikörper BB7.2 verwendet, auf den HLA-A*0201-negativen Tumorzelllinien der anti-Human HLA-ABC Klasse I Antikörper W6/32.

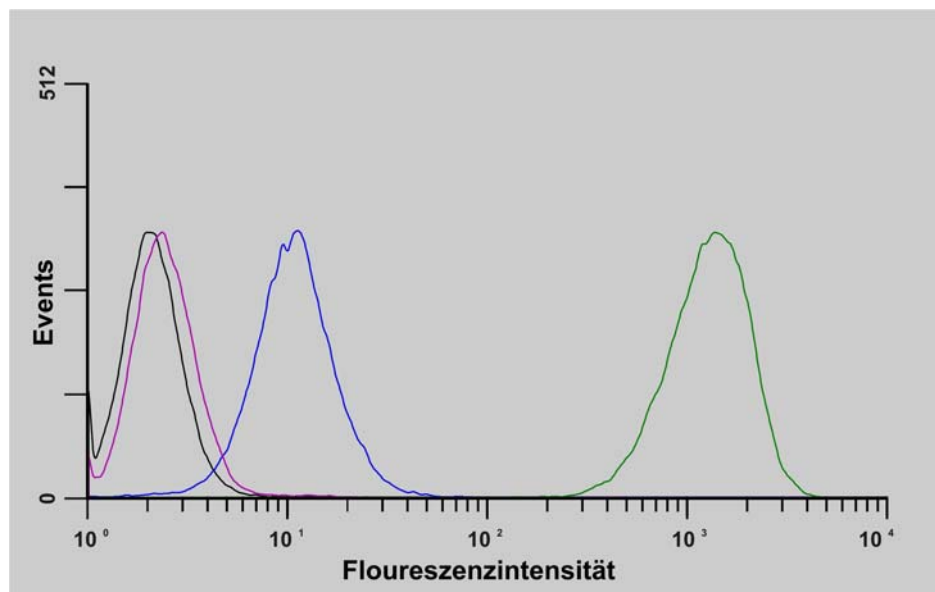
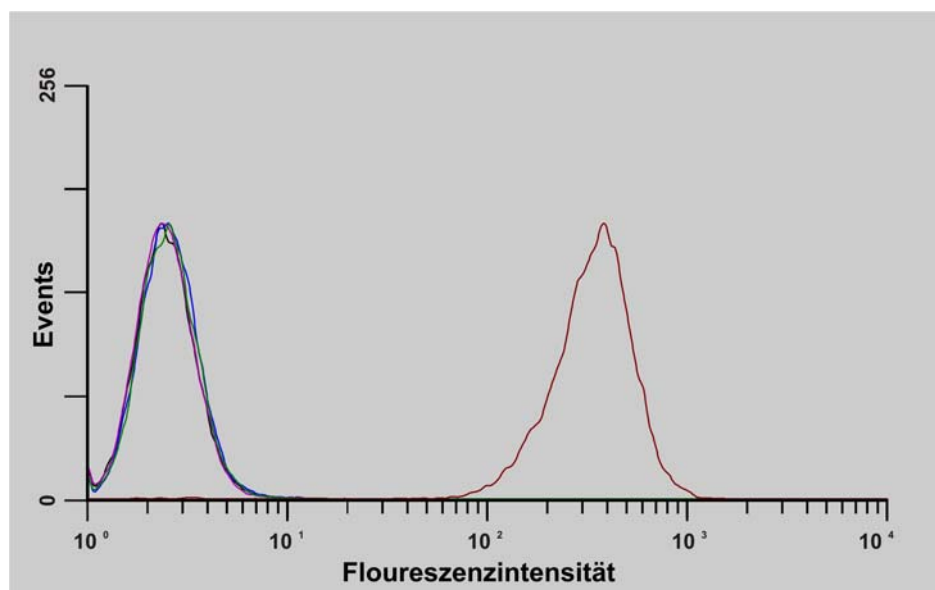
Im Folgenden sind die mit den unbiotinylierten Fab-Antikörpern erzielten durchflusszytometrischen Ergebnisse dargestellt:

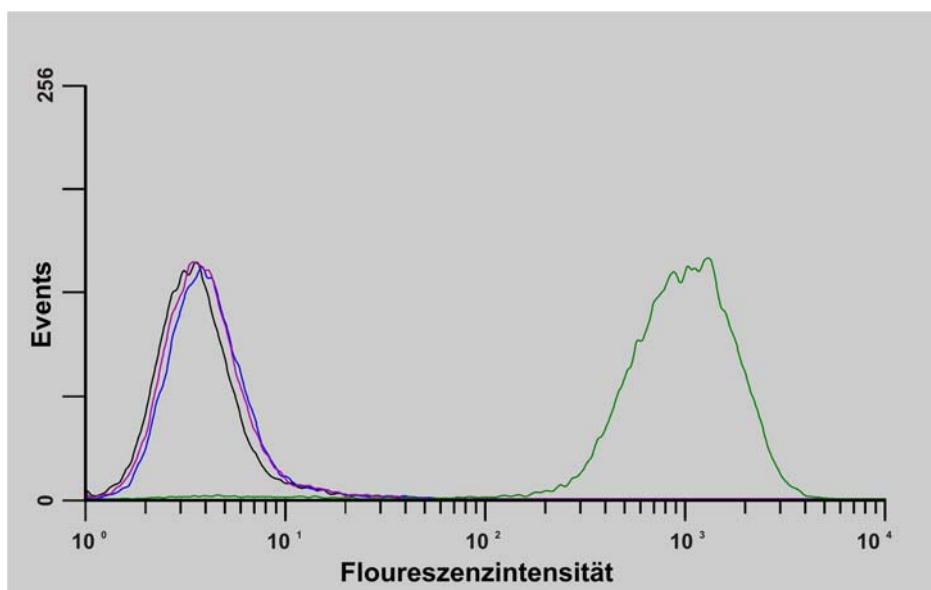
A) **Zelllinie Me 275:**



B) **Zelllinie Me 290:**



C) **Zelllinie Sk-Mel-23**D) **Zelllinie Me 260:**

E) **Zelllinie Sk-Mel-37:**

Abbildungen 37: Durchflusszytometrie der Fab-Antikörper E6 und H4 auf Tumorzellen

A) Me 275; B) Me 290; C) Sk-Mel-23; D) Me 260; E) Sk-Mel-37

Für alle gilt folgende Farbcodierung: blau: Zellen gefärbt mit dem Fab-Antikörper E6; violett: Zellen gefärbt mit dem Fab-Antikörper H4; grün: Zellen gefärbt mit dem Antikörper BB7.2 (Positivkontrolle auf HLA-A*0201-positiven Zelllinien); braun: Zellen gefärbt mit dem Antikörper W 6/32 (Positivkontrolle auf den HLA-A*0201-negativen Zelllinien); schwarz: Zellen gefärbt mit sekundären Antikörpern (Negativkontrolle)

Die durchflusszytometrischen Analysen auf den Positivlinien Me 275, Me 290 sowie Sk-Mel-23 ergaben für die Fab-Antikörper der Klone E6 und H4 folgendes Bild: Mit dem Klon E6 ließ sich auf allen drei Positivlinien eine deutlich FI-Änderung erzielen, wohingegen sich mit dem Klon H4 nur auf den Tumorklinien Me 290 und Sk-Mel-23 eine FI-Änderung erzielen ließ. Auf den beiden Negativlinien Me 260 und Sk-Mel-37 ließ sich dagegen mit beiden Klonen keine deutliche FI-Änderung erzielen.

Die bisher erzielten Ergebnisse bedurften jedoch aufgrund folgender Tatsache einer zusätzlichen Validierung: Zellen präsentieren auf ihrer Oberfläche nur wenige Kopien eines individuellen Peptides im Kontext eines MHC-Peptid-Komplexes. Die durch den Fab-Antikörper E6 gemessenen FI-Änderungen deuteten jedoch auf eine relativ hohe Kopienzahl hin. Des Weiteren konnte eine nur marginale FI-Änderung durch eine geringe Dichte des Antigens auf der Zelloberfläche bedingt sein, aber auch durch eine unspezifische Adhärenz des Antikörpermoleküls auf der Zellmembran.

Aus diesem Grund wurden in einem weiteren Schritt Inhibitionsexperimente auf den Positivlinien durchgeführt. Das Prinzip dieser Versuchsreihe ist dabei Folgendes: Ist die FI-Änderung durch eine spezifische Antikörper/Antigen-Interaktion bedingt sein,

muss ein „heißer“ Antikörper sich durch einen „kalten“ Antikörper aus seiner Bindung verdrängen lassen. Haftet der Antikörper als großes Molekül unspezifisch, d.h. die Interaktion ist nicht durch seine Antigenbindungsstelle vermittelt, das Molekül „klebt“ lediglich an der Zellmembran, so kann er in den üblicherweise eingesetzten Konzentrationen nicht verdrängt werden.

Die Tumorzellen wurden schließlich einerseits mit dem unbiotinylierten „kalten“ Fab-Antikörper E6 und andererseits mit einem Kontroll-Fab-Antikörper, welcher das Melan-A-Peptid im Kontext des HLA-A*0201-Komplexes nicht erkannte, in einer vierfach höheren Konzentration vorinkubiert. Diese Inkubation hatte zum Ziel, den EAA/ HLA-A*0201 für den dann folgenden biotinylierten „heißen“ Fab-Antikörper E6-b zu blockieren, so dass keine FI-Änderung in der Durchflusszytometrie mehr erfolgen kann.

Um zu gewährleisten, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen grundsätzlich eine Inhibition zu erreichen ist, wurde vor Durchführung auf Tumorzelllinien ein Inhibitionsversuch auf von extern mit Peptiden beladenen T2-Zellen durchgeführt.

Dargestellt sind im Folgenden die Ergebnisse der Durchflusszytometrie auf T2-Zellen. Die Peptidbeladung erfolgte in Form einer Verdünnungsreihe von Melan-A₂₆₋₃₅ EAA, beginnend bei 2 µg/ml.

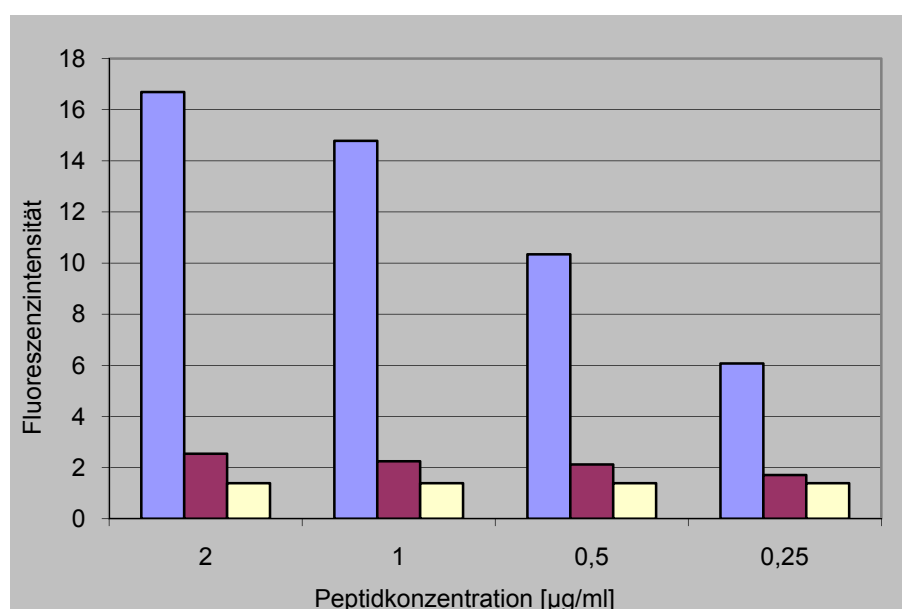


Abbildung 38: Blockversuch auf T2-Zellen, beladen mit einer Verdünnungsreihe von Melan-A₂₆₋₃₅ EAA

Es gilt folgende Farbcodierung: blau: beladene T2-Zellen ohne blockierenden Fab-Antikörper (Positivkontrolle); violett: beladene T2-Zellen mit blockierendem Fab-Antikörper E6; gelb: beladene T2-Zellen gefärbt mit sekundären Antikörpern (Negativkontrolle)

Die Abbildung 38 zeigte, dass es nach Vorinkubation der beladenen T2-Zellen mit dem unbiotinylierten Fab-Antikörper E6 zu einer effizienten Blockierung kam und der biotinylierte Fab-Antikörper fast nicht mehr binden und detektiert werden konnte. Daraus konnte folglich geschlossen werden, dass der Fab-Antikörper E6 grundsätzlich in der Lage sein musste, eine Bindung des Fab-Antikörpers E6-b zu blockieren, was eine Voraussetzung für die folgenden Analysen auf den Tumorzelllinien Me 275, Me 290 sowie Sk-Mel-23 darstellte. Die Blockversuche auf den Tumorzelllinien wurden ferner ergänzt durch einen irrelevanten Fab-Antikörper, welcher nicht imstande war, das Melan-A₂₆₋₃₅ EAA im Kontext eines HLA-A*0201-Komplexes zu erkennen. In diesem Fall wurde der Fab-Antikörper VIE1-b verwendet.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie auf den Tumorzelllinien Me 275, Me 290 sowie Sk-Mel-23 dargestellt:

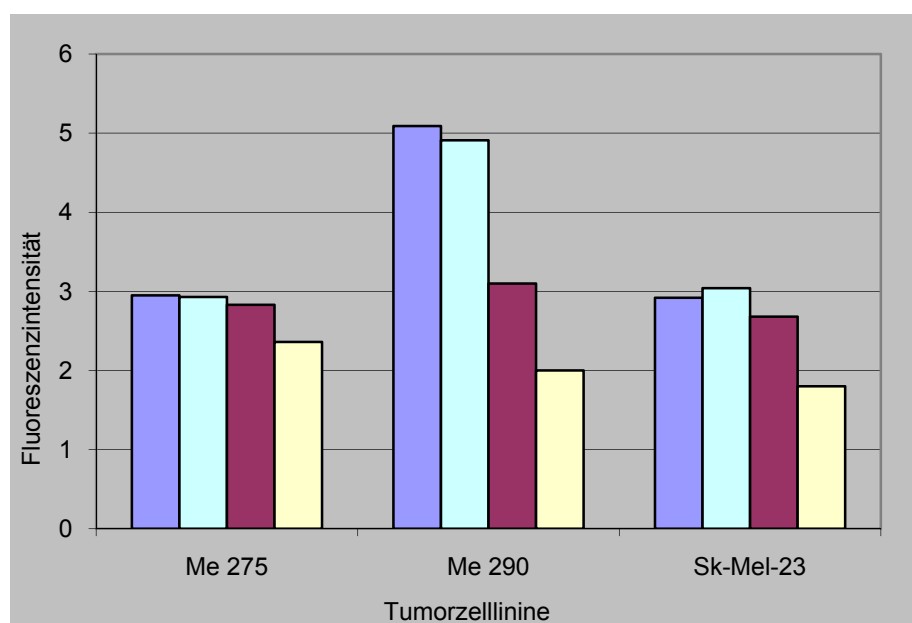


Abbildung 39: Blockversuch mit den blockierenden Fab-Antikörpern VIE1 sowie E6 auf Tumorzelllinien

Es gilt folgende Farbcodierung: blau: Zellen gefärbt mit E6-b ohne blockierenden Fab-Antikörper (Positivkontrolle); türkis: Zellen gefärbt mit E6-b und blockierendem Fab-Antikörper VIE1; rot: Zellen gefärbt mit E6-b und blockierendem Fab-Antikörper E6; gelb: Zellen ohne blockierende Fab-Antikörper, gefärbt mit sekundären Antikörpern (Negativkontrolle)

Zusätzlich wurde als blockierender Antikörper der Fab-Antikörper H4 eingesetzt, der ebenfalls spezifisch für EAA/HLA-A*0201 ist. Im Folgenden wird eine Wiederholung des Blockversuches auf der Tumorzelllinie Me 290 dargestellt, ergänzt durch den Fab-Antikörper H4:

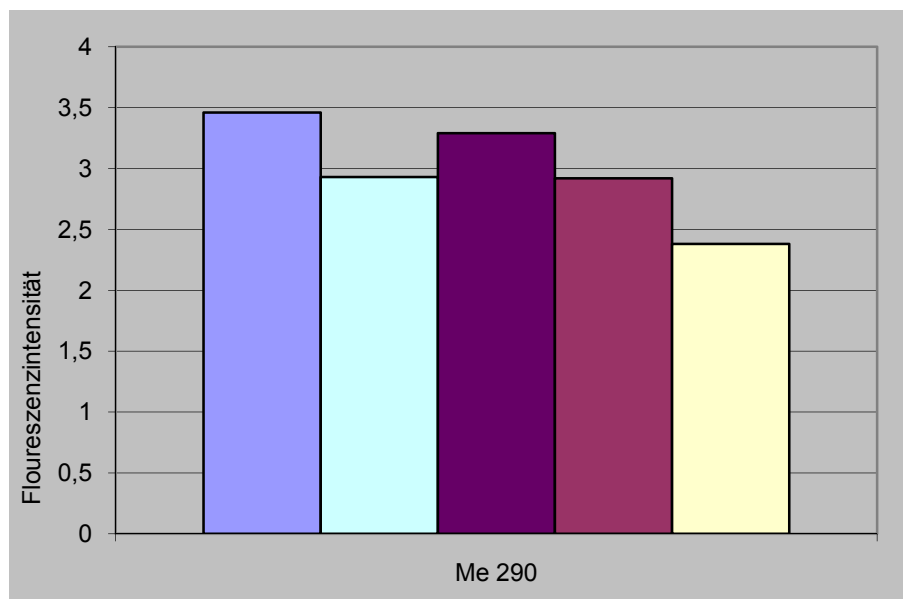


Abbildung 40: Blockversuch auf der Zelllinie Me290 mit den blockierenden Fab-Antikörpern VIE1, H4 sowie E6

Es gilt folgende Farbcodierung: blau: Zellen gefärbt mit E6-b ohne blockierenden Fab-Antikörper (Positivkontrolle); türkis: Zellen gefärbt mit E6-b und blockierendem Fab-Antikörper VIE1; violett: Zellen gefärbt mit E6-b und blockierendem Fab-Antikörper E6; rot: Zellen gefärbt mit E6-b und blockierendem Fab-Antikörper H4; gelb: Zellen ohne blockierende Fab-Antikörper, gefärbt mit sekundären Antikörpern (Negativkontrolle)

Die Ergebnisse mit der Zelllinie Me 290 ließen schließlich den Schluss zu, dass die Bindung des Fab-Antikörpers E6-b auf Melan-A-positiven Tumorzelllinien eine spezifische Antigen/Antikörper-Interaktion darstellt. Durch den unbiotinylierten Fab-Antikörper E6 ließ sich die Interaktion eines biotinylierten Fab-Antikörpers E6 inhibieren. Eine Inhibition durch den Fab-Antikörper H4 mit identischer Spezifität war jedoch nicht möglich. Dies ließ den Schluss zu, dass der Fab-Antikörper kreuzreaktiv zu einer Struktur auf der Tumorzelllinie Me290 distinkt von der des EAA/HLA-A*0201 ist, welche vom Fab-Antikörper H4 nicht erkannt wurde. Weiter war festzustellen, dass die Signalintensität auf der Zelllinie Me290 in mehreren Messungen erheblich schwankte.

Es konnte demzufolge zusammenfassend festgestellt werden, dass der EAA/HLA-A*0201 mittels durchflusszytometrischer Analysen auf Tumorzellen nicht valide detektiert werden kann.

4.2 *Detektion des MHC-Peptid-Komplexes auf infizierten Zellen*

Die folgende Versuchsreihe beschäftigte sich nun mit der Detektion endogen prozessierte Peptide auf der Zelloberfläche: Auf mit Viren infizierten HLA-A*0201 positiven EBV-immortalisierten B-Zellen. Als Viren wurden dabei rekombinante Vaccinia Viren (rVV) eingesetzt, welche entweder für das Melan-A Protein oder das Melan-A A27L ELA Peptid kodierten.

Die Versuchsreihe lässt sich wie folgt beschreiben: In einem ersten Schritt sollte untersucht werden, ob nach Infektion von Melan-A negativen EBV-immortalisierten B-Zellen gesunder Spender mit rekombinanten Vaccinia-Viren (rVV) eine durchflusszytometrische Detektion der endogen prozessierten und im Kontext des HLA-A*0201-Komplexes präsentierten Melan-A-Peptide durch die beiden Fab-Antikörper E6-b und H4-b erreicht werden kann. Im Fall einer spezifischen Detektion des MHC-Peptid-Komplexes kann man sich den Versuchsaufbau zu Nutze machen, um die Effizienz der Antigenprozessierung in EBV-immortalisierten B-Zellen genauer zu untersuchen: In den rVV-kodierenden Vektor wurde entweder eine das gesamte Melan-A-Protein kodierende Sequenz mit Substitution der Aminosäure Alanin durch Leucin an Position 27 (A27L), im Folgenden als GFP-Ub-Melan-A A27L bezeichnet, oder aber eine das Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA-Peptid, im Folgenden als GFP-Ub-ELA bzw. Minigen bezeichnet, kodierende Sequenz eingefügt. In beiden Fällen erfolgte die Einfügung am 3'Ende einer GFP-Ubiquitin-Sequenz, so dass nach Transkription ein Fusionsprodukt entsteht. Dieses wird anschließend in eukaryontischen Zellen posttranslational durch Ubiquitin-spezifische Proteasen gespalten, so dass letztlich äquimolare Mengen an GFP-Ubiquitin sowie Melan-A A27L Protein bzw. Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA-Peptid in der Zelle vorliegen. Aufgrund dieser Tatsache kann mittels Analyse der Menge an GFP (welche äquimolar der Menge an Melan-A Protein bzw. ELA-Peptid ist) eine Korrelation zwischen produzierter und folglich im Zytoplasma vorliegender Menge an Peptid bzw. Protein und der letztlich im Kontext von HLA-A*0201 auf der Zelloberfläche präsentierten Menge erfolgen.

Nach Infektion der Melan-A negativen EBV-immortalisierten B-Zellen mit den rekombinanten Vaccinia-Viren für 24 Stunden erfolgte eine Oberflächenfärbung mittels E6-b und H4-b und Analyse mittels Durchflusszytometrie. Um eine unspezifische Bin-

dung der Fab-Antikörper auf der Oberfläche der EBV-immortalisierten B-Zellen auszuschließen, wurden als Negativkontrolle ebenfalls Melan-A negative und HLA-A*0201 positive EBV-immortalisierte B-Zellen verwendet. Diese wurden unter analogen Bedingungen ebenso einen Tag vor der Oberflächenfärbung in eine 6-well-Platte ausgesät und der gleichen Anzahl an Waschschritten unterzogen, jedoch nicht mit Viren infiziert.

Die durchflusszytometrische Analyse detektierte bei den infizierten Zellen zwei Signale: Einerseits ein Signal im PE-Kanal, welches aus der Oberflächenfärbung mit den Fab-Antikörpern stammt, sowie andererseits ein Signal im FITC-Kanal, welches vom intrazellulären GFP stammt. Im ersten Schritt der durchflusszytometrischen Analysen erfolgte ein Vergleich der FITC-Signale infizierter und nicht-infizierter Zellen (reine Zellen, ohne Färbung mit PE), was als Infektionskontrolle diente.

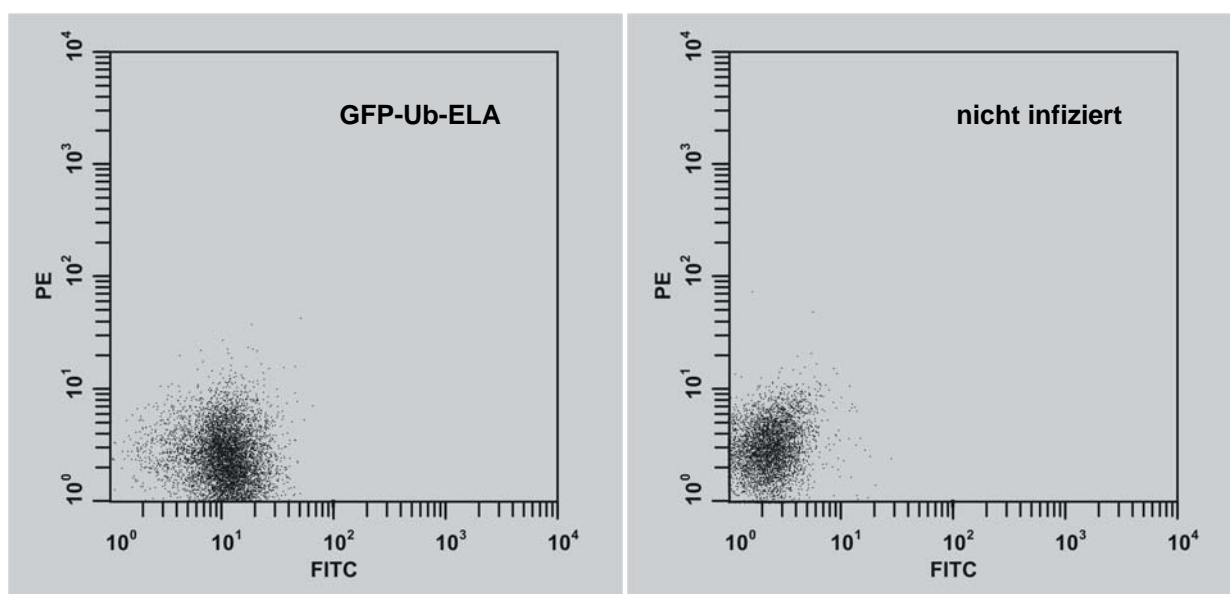


Abbildung 41: Darstellung der FITC-Signale GFP-Ub-ELA infizierter (links) und nicht infizierter (rechts) EBV-immortalisierter B-Zellen

Man erkennt an den beiden oben dargestellten „Dotplots“, dass die Infektion mit dem Fusionsgen GFP-Ub-ELA zu einem hohen Prozentsatz an infizierten und somit über FITC detektierbaren EBV-immortalisierten B-Zellen führte. Die nicht mit rVV infizierten Zellen, dargestellt im rechten „Dotplot“, zeigten dagegen keine FI-Änderung im FITC-Kanal.

Nachdem gezeigt worden war, dass jeweils ein ausreichend hoher Prozentsatz der verwendeten EBV-immortalisierten B-Zellen tatsächlich durch die rVV infiziert wur-

den, erfolgte in einem nächsten Schritt schließlich die Oberflächenfärbung mit den Fab-Antikörpern E6-b und H4-b.

Es wurden in der Durchflusszytometrie jeweils nur die vitalen Zellen analysiert.

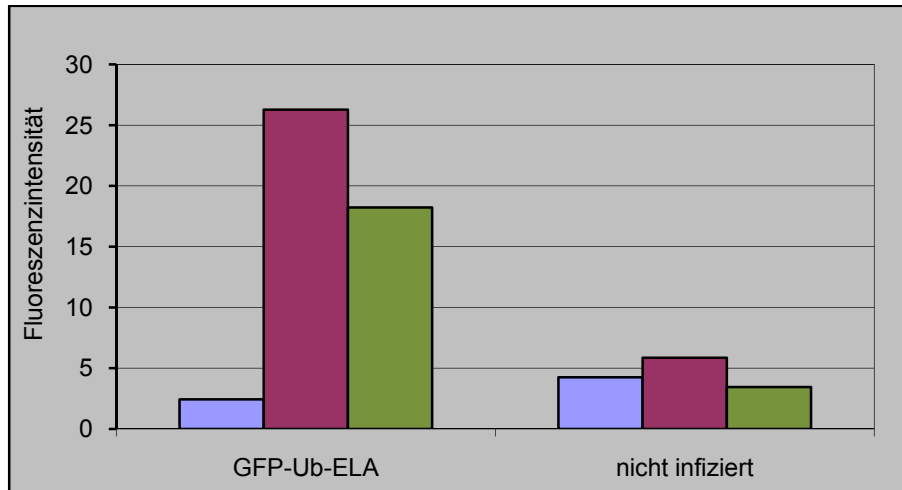


Abbildung 42: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten nach Infektion von EBV-immortalisierten B-Zellen mit rVV und Oberflächenfärbung mit den biotinylierten Fab-Antikörpern E6-b (violett) sowie H4-b (grün). Blau: Negativkontrolle

Es zeigte sich, dass es im Fall von GFP-Ub-ELA zu einer deutlichen FI-Zunahme in der Durchflusszytometrie gekommen war. Nach Färbung der nicht infizierten EBV-immortalisierten B-Zellen wurde keine FI-Zunahme detektiert.

Die Ergebnisse der Infektion mit GFP-Ub-ELA zeigten, dass eine spezifische Detektion endogen prozessierter und anschließend im Kontext des HLA-A*0201-Komplexes präsentierter Melan-A-Peptide mit den Fab-Antikörpern E6-b und H4-b möglich war.

Die nun folgenden Analysen beschäftigten sich mit folgenden Fragestellungen:

- Wie ist das Verhältnis zwischen intrazellulär synthetisierten Melan-A Protein bzw. ELA-Peptid und den auf der Zelloberfläche präsentierten MHC-Peptid-Komplexen?
- Wie effizient ist die Antigenprozessierung des ELA/HLA-A*0201 Komplex?

Da die GFP-Expression aufgrund des Fusionsproduktes als äquimolar zur ELA-Peptid- bzw. Melan-A-Protein-Expression angesehen werden konnte, erfolgte eine quantitative Bestimmung der GFP-Menge. Dies geschah in Form eines Westernblots:

Dazu wurden nach 24-stündiger Infektion der EBV-immortalisierten B-Zellen jeweils eine definierte Menge infizierter, grün-fluoreszierender Zellen separat präpariert. Nach elektrophoretischer Auftrennung des gesamten Zelllysates im SDS-Gel erfolgte die Detektion des GFP mittels eines anti-GFP-Antikörpers. Gleichzeitig erfolgte, zur Quantifizierung der Menge an GFP, eine SDS-Gelelektrophorese einer Verdünnungsreihe mit exakt quantifiziertem rekombinant hergestelltem GFP, welche ebenfalls einer Färbung mittels des anti-GFP-Antikörpers unterzogen wurde.

Im Folgenden dargestellt werden einerseits der Westernblot der GFP-Verdünnungsreihe sowie andererseits der Westernblot der EBV-immortalisierten B-Zellen, wobei eine Färbung nicht infizierter Zellen als Negativkontrolle diente.

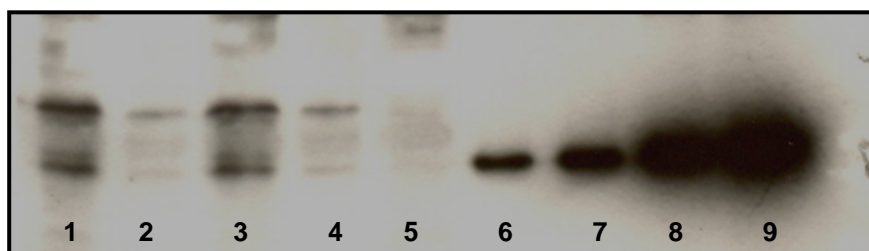


Abbildung 43: Westernblot der GFP-Verdünnungsreihe (Spalte 6-9) sowie der infizierten EBV-immortalisierten B-Zellen (Spalte 1-5)

Es gilt für Spalte 1 bis 5: Spalte 1 und 2: GFP-Ubiquitin-Melan-A A27L ($1,7 \cdot 10^4$ bzw. $0,4 \cdot 10^4$ infizierte Zellen); Spalte 3 und 4: GFP-Ubiquitin-ELA ($1,7 \cdot 10^4$ bzw. $0,4 \cdot 10^4$ infizierte Zellen); Spalte 5: nicht infizierte Zellen ($1,7 \cdot 10^4$ vitale Zellen)

Es gilt für Spalte 6 bis 9: Spalte 6: 1 ng GFP; Spalte 7: 3 ng GFP; Spalte 8: 7,5 ng GFP; Spalte 9: 15 ng GFP

Die quantitative GFP-Bestimmung wurde schließlich auf folgende Weise durchgeführt: Die Intensität der Banden der Verdünnungsreihe wurde ebenso wie die Banden des Westernblots der infizierten EBV-immortalisierten B-Zellen anhand der Daten aus der Auswertung mittels Densitometer quantitativ mit einem Densitometer analysiert und schließlich die Zahlenwerte der GFP-Verdünnung in einem Diagramm gegen die jeweilige Menge an GFP-Molekülen aufgetragen. Aus der entstandenen Regressionsgeraden konnte nun für eine bestimmte Zahl an infizierten EBV-immortalisierten B-Zellen die jeweilige Menge an GFP und somit auch an ELA-Peptid bzw. Melan-A A27L Protein bestimmt werden (da GFP und ELA-Peptid bzw. Melan-A A27L Protein in äquimolarer Menge synthetisiert werden).

Die Expression von GFP-Ubiquitin-ELA betrug nach einer 24-stündigen Infektionszeit im Mittel $2,2 \cdot 10^5$, die des GFP-Ubiquitin-Melan-A A27L Fusionsproteins im Mittel $1,9 \cdot 10^5$.

Bei genauer Betrachtung der Westernblots der Zelllysate infizierter Zellen fiel auf, dass sich mit dem anti-GFP-Antikörper sowohl im Fall des ELA-Peptides als auch im Fall des Melan-A Proteins zwei Banden anfärben ließen, beide mit einer Größe zwischen 30 und 40 kDA. Im Vergleich mit dem Westernblot der GFP-Verdünnungsreihe lag die kleinere der beiden Banden auf gleicher Höhe wie GFP, was darauf schließen ließ, dass diese Bande tatsächlich reinem GFP entsprach. Da jedoch beide Banden mit dem anti-GFP-Antikörper dargestellt werden konnten, wurden zur quantitativen Bestimmung der GFP-Menge beide Banden herangezogen.

Zum Ursprung der größeren Bande wurde folgende Überlegung angestellt: Die Färbung im Westernblot erfolgte auf ein elektrophoretisch aufgetrenntes komplettes Zelllysate infizierter EBV-immortalisierten B-Zellen. Wie bereits oben erwähnt, erfolgte die Expression des Melan-A Proteins bzw. ELA-Peptides als Fusionsprodukt mit GFP-Ubiquitin. Dieses wird erst posttranslationell enzymatisch gespalten, so dass man davon ausgehen konnte, dass zum Zeitpunkt der Zellpräparation auch eine gewisse Menge an GFP-Ubiquitin im Zytoplasma vorlag. Es konnte somit angenommen werden, dass dieses die zweite, größere Bande im Westernblot darstellt.

Zum Nachweis erfolgte eine erneute Analyse des bereits vorhandenen Westernblots: Dazu wurde dieser „gestrippt“, d.h. die bereits gebundenen Antikörper und Detektionsreagenzien mittels eines „Stripping-Puffers“ entfernt, und die Membran einer neuen Färbung unterzogen. Diese erfolgte mit einem anti-Ubiquitin-Antikörper und ist im Folgenden dargestellt:

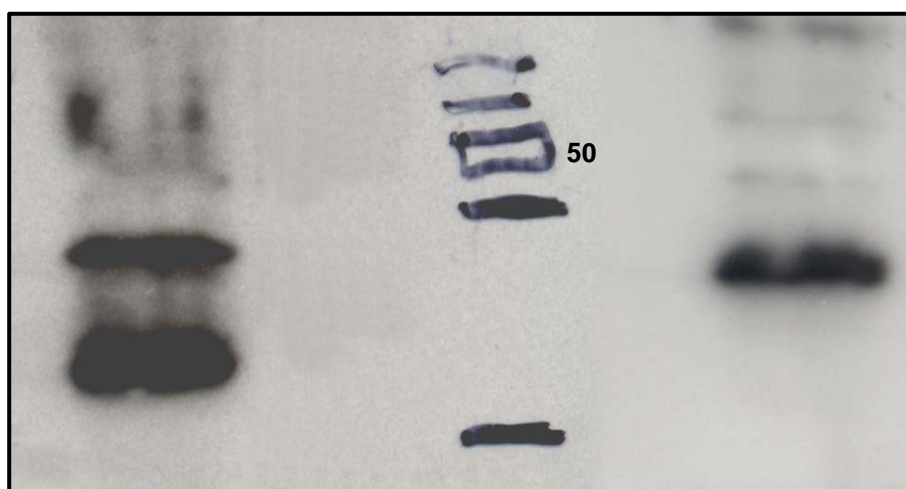


Abbildung 44: Westernblot mit dem anti-GFP-Antikörper entwickelt (links) sowie nach Strippen mit dem anti-Ubiquitin-Antikörper (rechts); in der Mitte ist der Längenmarker dargestellt.

Es zeigte sich, dass sich die Überlegung bezüglich der Herkunft der größeren der beiden Banden als richtig erwiesen hat: Sie stellt in der Tat ein GFP-Ubiquitin-Fusionsprotein dar.

In einem zweiten Schritt erfolgte die quantitative Bestimmung der MHC-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche. Dazu wurde, ausgehend von den durch die Oberflächenfärbung ermittelten Fluoreszenzintensitäten, die Anzahl der PE-Moleküle pro Zelle bestimmt. Als Grundlage dafür dienten PE-Kalibrierungs-Beads.

Mittels Durchflusszytometrie konnte auf diese Weise eine Korrelation zwischen der in den PE-Kalibrierungs-Beads enthaltenen Menge an PE-Molekülen und der jeweiligen Fluoreszenzintensität erfolgen. Durch lineare Regression wurde anschließend für die Fluoreszenzintensitäten der Färbung mit E6-b und H4-b die jeweilige Menge an MHC-Peptid-Komplex ermittelt. Folgende Bedingungen wurden hierfür zugrunde gelegt:

- Pro Fab-Antikörper kann nur ein Molekül Streptavidin-PE binden
- Pro MHC-Peptid-Komplex kann nur ein Fab-Antikörpermolekül binden

Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der GFP- sowie MHC-Peptid-Komplex-Quantifizierung wieder:

Tabelle 1: Quantifizierung der MHC-Expression auf EBV-immortalisierten B-Zellen nach Infektion mit rVV.

A)	Unabhängiges Experiment	Expression [Molekülzahl]	Präsentation der MHC-Peptid-Komplexe [Molekülzahl]	Verhältnis Expression / Präsentation
	1	$2,2 \cdot 10^6$	120	1 / 18.000
	2	$2,1 \cdot 10^6$	65	1 / 32.000
	3	$2,3 \cdot 10^6$	140	1 / 16.000
	4	$2,6 \cdot 10^6$	50	1 / 52.000
	5	$2,6 \cdot 10^6$	60	1 / 43.000

B)	Unabhängiges Experiment	Expression [Molekülzahl]	Präsentation der MHC-Peptid-Komplexe [Molekülzahl]	Verhältnis Expression / Präsentation
	1	$2,1 \cdot 10^6$	1.820	1 / 1.100
	2	$2,1 \cdot 10^6$	820	1 / 2.600
	3	$1,9 \cdot 10^6$	760	1 / 2.500
	4	$2,0 \cdot 10^6$	1.620	1 / 1.200
	5	$2,3 \cdot 10^6$	1.400	1 / 1.600

A) GFP-Melan-A A27L; B) GFP-ELA

Abschließend konnte nun das Verhältnis zwischen der Expression von GFP-ELA bzw. GFP-Melan-A A27L und der Präsentation von ELA im Kontext des HLA-A*0201-Komplexes bestimmt werden. Im Fall des GFP-ELA betrug das Verhältnis ca. 1/2.600, im Fall des GFP-Melan-A A27L ca. 1/26.000. Diese Ergebnisse ließen die Vermutung zu, dass es im Fall der vom Melan-A Protein abgeleiteten Peptide, welche im Kontext des HLA-A*0201 präsentiert werden, zu einer ineffizienten Prozessierung gekommen war.

5 *Bindungskinetik selektionierter Fab-Antikörper*

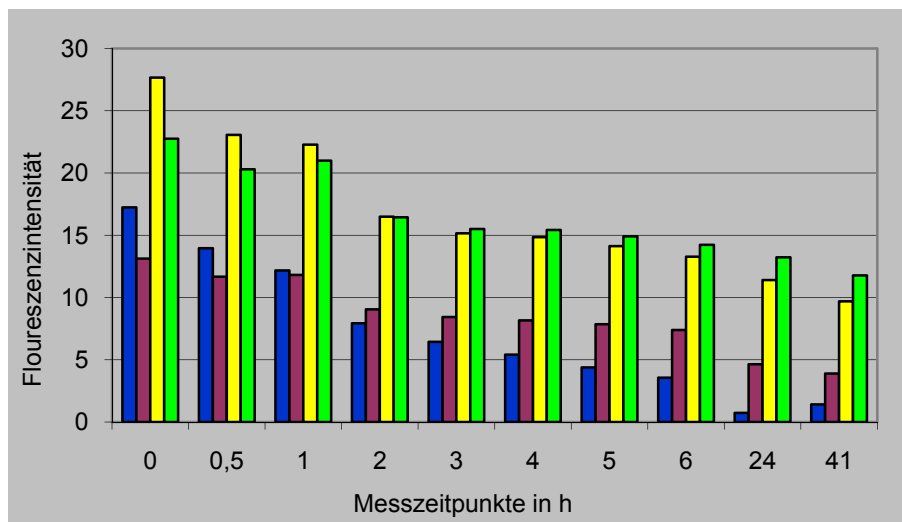
In diesem Abschnitt sollte mittels diverser Versuchsanordnungen die Bindungskinetik der selektionierten Fab-Antikörper E6 und H4 untersucht werden. Dazu wurden einerseits durchflusszytometrische Analysen der Fab- und Peptid-Dissoziation auf von extern mit Peptiden beladenen Zellen sowie andererseits Kinetikmessungen mittels Oberflächenplasmonresonanz angewandt.

5.1 *Analyse der Dissoziation der Fab-Antikörper vom MHC-Peptid-Komplex mittels Durchflusszytometrie*

Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Bindungseigenschaften der Fab-Antikörper der Klone E6 und H4 näher zu charakterisieren. Im Speziellen sollte hier die Dauer der Bindung des Fab-Antikörpers an den von extern beladenen MHC-Peptid-Komplex mittels Durchflusszytometrie auf T2-Zellen untersucht werden. Es wurde dabei folgendermaßen vorgegangen: Die T2-Zellen wurden von extern für ca. 90 Minuten in reinem RPMI-Medium mit den Peptiden Melan-A₂₆₋₃₅ EAA sowie Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA beladen, anschließend mit den Fab-Antikörpern E6-b sowie H4-b gefärbt und schließlich in reinem PBS resuspendiert. Diese Suspensionen wurden sodann bei 25° C im Dunklen aufbewahrt und zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Durchflusszytometrie die Antikörperbindung analysiert:

Es wurde jeweils die absolute Fluoreszenzintensität sowie der relative FI-Wert, bezogen auf die erste Messung am Zeitpunkt 0 Minuten, ermittelt.

A)



B)

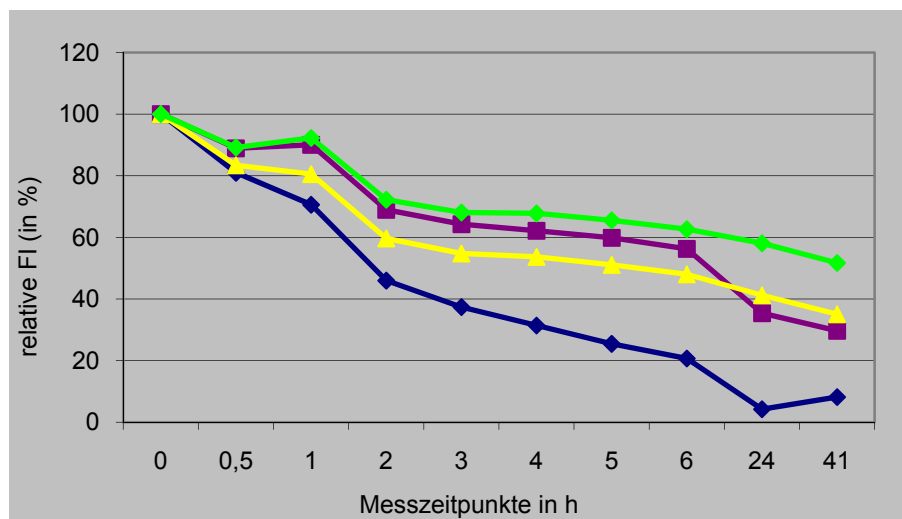


Abbildung 45: Durchflusszytometrische Bestimmung der Dissoziation der Fab-Antikörper von beladenen T2-Zellen

A) Darstellung der absoluten Fluoreszenzintensität; B) Darstellung der prozentualen Fluoreszenzintensität im Verhältnis zum Wert am Messpunkt bei 0 Stunden. Für beide gilt folgende Farbcodierung: blau: E6-b auf T2-Zellen, beladen mit Melan-A₂₆₋₃₅ EAA; violett: H4-b auf T2-Zellen, beladen mit Melan-A₂₆₋₃₅ EAA; gelb: E6-b auf T2-Zellen, beladen mit Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA; grün: H4-b auf T2-Zellen, beladen mit Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA

Diese Darstellung der absoluten Fluoreszenzintensität konnte die bereits gewonnenen Ergebnisse bezüglich der Affinität der Fab-Antikörper zu den beiden MHC-Peptid-Komplexen in sofern bestätigen, als zu Beginn der Messreihe am Zeitpunkt 0 die FI-Werte bei beiden Klonen auf den mit ELA beladenen T2-Zellen höher waren. Des Weiteren wurden die Ergebnisse bezüglich der Unterschiede in der Affinität der beiden Klone zu den jeweiligen MHC-Peptid-Komplexen bestätigt: Zum Zeitpunkt 0 fand sich sowohl auf den mit Melan-A₂₆₋₃₅ EAA als auch auf den mit Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA beladenen T2-Zellen höhere FI-Werte nach Färbung mit dem Fab-Antikörper E6-b.

Nach Beginn der eigentlichen Analyse, dem Verfolgen der Bindung auf längere Zeit, kehrte sich eine bisherige Beobachtung um: Bereits zwei Stunden nach Beendigung der Färbeschritte fanden sich auf beiden MHC-Peptid-Komplexen bei dem Fab-Antikörper H4-b im Vergleich mit dem Fab-Antikörper E6-b höhere FI-Werte. Dies ließ auf eine geringere Dissoziation des Klon H4 vom MHC-Peptid-Komplex schließen.

Im Vergleich der beiden Peptide erfolgte jedoch keine Umkehrung, auch nach 41 Stunden zeigen sich bei beiden Klonen auf den mit ELA beladenen T2-Zellen in der Durchflusszytometrie noch höhere FI-Werte.

5.2 *Analyse der Peptiddissoziation mittels Durchflusszytometrie*

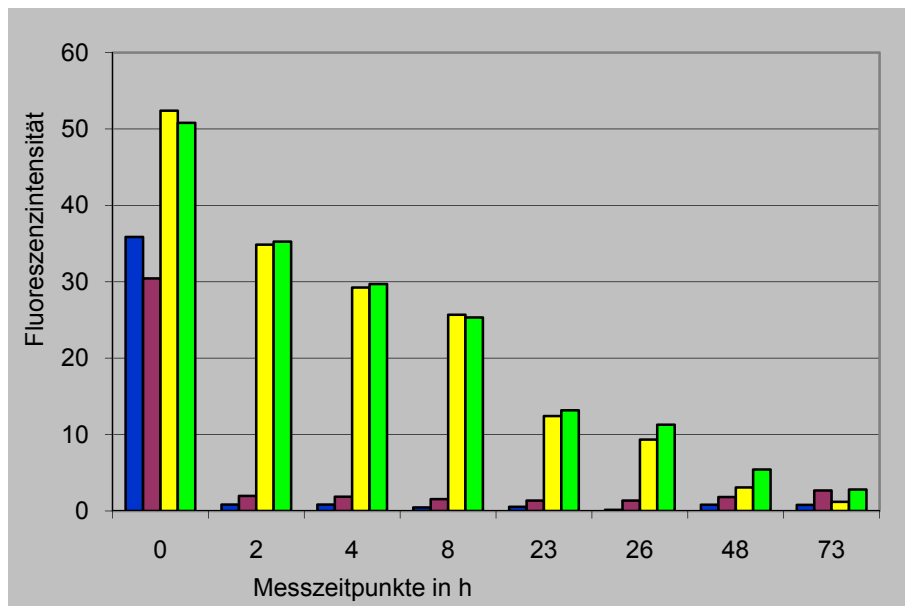
Ziel dieser Versuchsreihe war es, das Bindungsverhalten der Peptide Melan-A₂₆₋₃₅ EAA sowie Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA nach Beladung HLA-A*0201-positiver Zellen zu untersuchen und zu vergleichen. Dazu wurden jeweils ca. 10⁶ Zellen für 90 Minuten in reinem RPMI bei 27° C mit den jeweiligen Peptiden inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit PBS/2%FCS sowie die Resuspendierung der Zellen in Zellkulturmedium. Diese Suspensionen wurden dann erneut bei 37° C im Brutschrank aufbewahrt. Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte eine Färbung mit den Fab-Antikörpern E6-b sowie H4-b mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse.

Analog zu der Analyse der Fab-Dissoziation wurden auch hier sowohl die absoluten FI-Werte als auch die prozentualen FI-Werte (bezogen auf den Absolutwert am Zeitpunkt bei 0 Stunden) ermittelt und graphisch dargestellt. Nach Inkubation mit anschließenden Waschschrten wurden von allen Proben jeweils zwei Ansätze erzeugt, so dass schließlich ein Mittelwert für jeden FI-Wert ermittelt werden konnte.

5.2.1 *Peptiddissoziation auf T2-Zellen*

In einem ersten Schritt erfolgte die Analyse der Dissoziation beider Peptide vom HLA-A2*0201-Komplex auf T2-Zellen.

A)



B)

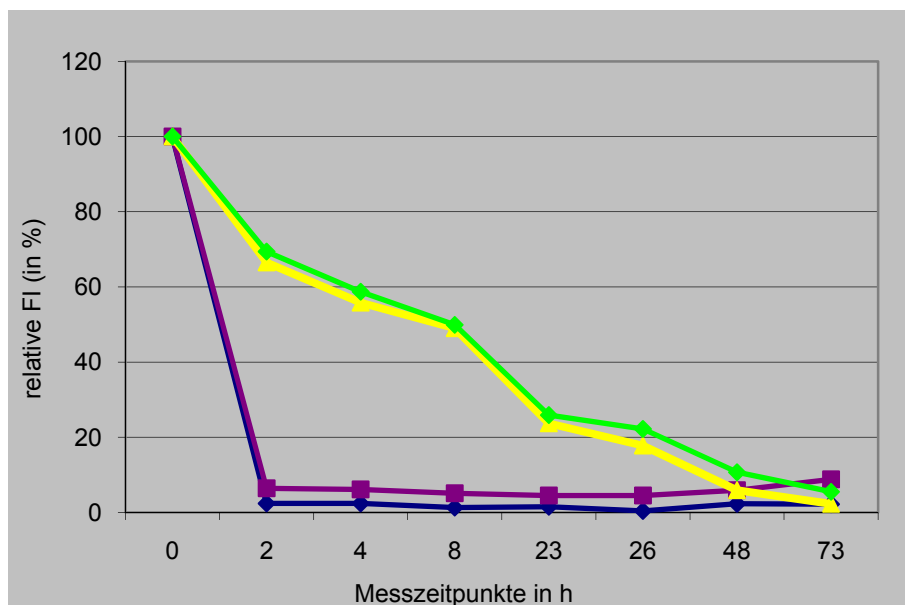


Abbildung 46: Durchflusszytometrische Bestimmung der Dissoziation von Melan-A₂₆₋₃₅ EAA und Melan-A₂₆₋₃₅ ELA von T2-Zellen

A) Darstellung der absoluten Fluoreszenzintensität; B) Darstellung der prozentualen Fluoreszenzintensität im Verhältnis zum Wert am Messzeitpunkt bei 0 Stunden.

Für beide gilt folgende Farbcodierung: blau: E6-b auf T2-Zellen, beladen mit Melan-A₂₆₋₃₅ EAA; violett: H4-b auf T2-Zellen, beladen mit Melan-A₂₆₋₃₅ EAA; gelb: E6-b auf T2-Zellen, beladen mit Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA; grün: H4-b auf T2-Zellen, beladen mit Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA

Bereits die Darstellung der absoluten FI-Werte bestätigte die bisherigen Ergebnisse der Durchflusszytometrie: Die FI-Werte nach Färbung mit E6-b und H4-b waren auf den mit Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA beladenen T2-Zellen zu allen Messzeitpunkten deutlich höher als auf mit Melan-A₂₆₋₃₅ EAA beladenen T2-Zellen.

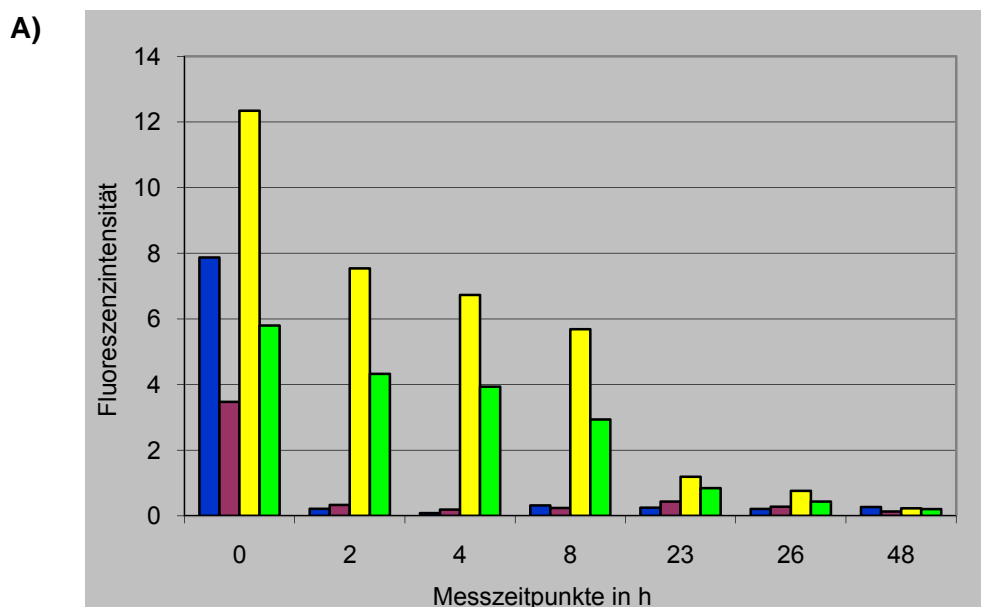
Die Darstellung der prozentualen FI-Werte zeigte einen deutlichen Unterschied in der Dissoziation der beiden Peptide: Bereits zum Zeitpunkt 2, zwei Stunden nach Ende

der Inkubationszeit, konnte mittels Durchflusszytometrie auf den mit Melan-A₂₆₋₃₅ EAA beladenen T2-Zellen mit beiden Fab-Antikörpern nur noch ein FI-Wert von weniger als zehn Prozent des Ausgangswertes erzielt werden. Dagegen ließen sich auf den mit Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA beladenen T2-Zellen mit beiden Fab-Antikörpern noch nach 26 Stunden FI-Werte erzielen, welche mehr als zehn Prozent der Ausgangs-FI-Werte betragen; 50 Prozent des Ausgangs-FI-Wertes und damit die Halbwertszeit wurden nach 8 Stunden erreicht.

Im Fall des Melan-A₂₆₋₃₅ EAA betrug die Halbwertszeit lediglich ca. 1,5 Stunden.

5.2.2 *Peptiddissoziation auf HLA-A*0201 positiven EBV-immortalisierten B-Zellen*

In einem zweiten Schritt erfolgte die Analyse der Bindungskinetik beider Peptide auf HLA-A*0201-positiven EBV-immortalisierten B-Zellen, welche ausschließlich von einem gesunden Spender stammten:



B)

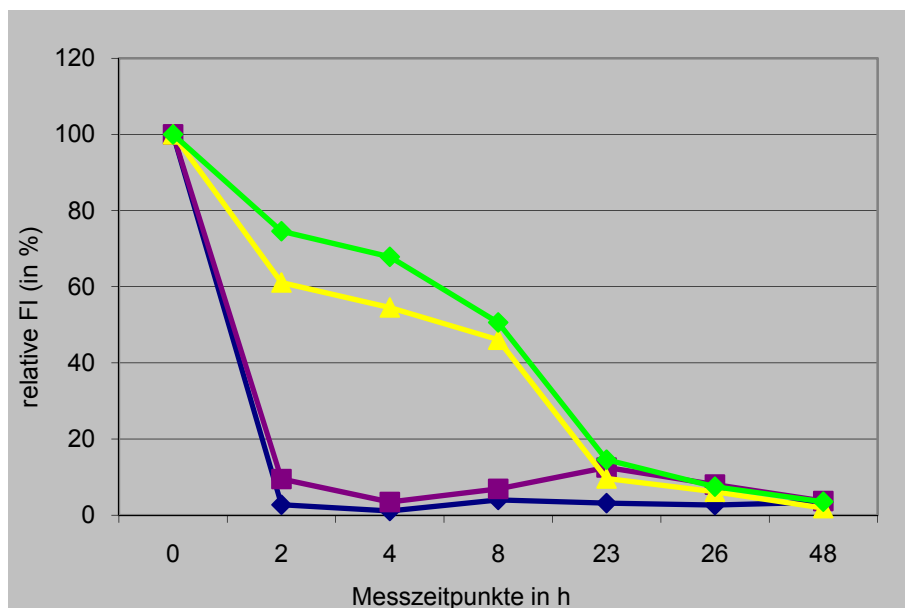


Abbildung 47: Durchflusszytometrische Bestimmung der Dissoziation von Melan-A₂₆₋₃₅ EAA und Melan-A₂₆₋₃₅ ELA von EBV-immortalisierten B-Zellen

A) Darstellung der absoluten Fluoreszenzintensität; B) Darstellung der prozentualen Fluoreszenzintensität im Verhältnis zum Wert am Messzeitpunkt bei 0 Stunden.

Für beide gilt folgende Farbcodierung: blau: E6-b auf T2-Zellen, beladen mit Melan-A₂₆₋₃₅ EAA; violett: H4-b auf T2-Zellen, beladen mit Melan-A₂₆₋₃₅ EAA; gelb: E6-b auf T2-Zellen, beladen mit Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA; grün: H4-b auf T2-Zellen, beladen mit Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA

Die Versuchsreihe auf EBV-immortalisierten B-Zellen konnte die Ergebnisse auf T2-Zellen bestätigen, die Dissoziation des Melan-A₂₆₋₃₅ EAA erfolgte wesentlich rascher als die des Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA: Bei Betrachtung der prozentualen FI-Werte bei der Fab-Antikörper auf mit Melan-A₂₆₋₃₅ EAA beladenen T2-Zellen ließ sich feststellen, dass auch auf EBV-immortalisierten B-Zellen bereits nach 2 Stunden die FI-Werte unter zehn Prozent der Ausgangs-FI-Werte abgesunken war; dagegen konnten auf den mit Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA beladenen EBV-immortalisierten B-Zellen noch nach 23 Stunden FI-Werte um zehn Prozent gemessen werden.

Es ließ sich außerdem feststellen, dass die Dissoziation beider Peptide auf EBV-immortalisierten B-Zellen wesentlich rascher erfolgte als auf T2-Zellen.

Im Fall des Melan-A₂₆₋₃₅ EAA betrug die Halbwertszeit ca. 1,5 Stunden, im Fall des Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA betrug sie ca. 6 Stunden.

5.3 *Analyse der Assoziation, Dissoziation und der Affinität mittels Oberflächenplasmonresonanz*

Nach Beladung des CM5-Chips mit den MHC-Peptid-Komplexen EAA/HLA-A*0201 sowie ELA/HLA-A*0201 erfolgte in einem ersten Schritt die Austestung der für den jeweiligen Fab-Antikörper optimalen Konzentrationen: Dazu wurde zunächst eine mittlere Konzentration ausgewählt und abhängig vom erzielten Signal (RU-Wert) konnten dann die folgenden Konzentrationsstufen höher oder niedriger gewählt werden. Im Folgenden sind die Konzentrationsstufen der beiden Fab-Antikörper, welche bei den Messungen letztlich zur Anwendung kamen, aufgeführt:

- Fab-Antikörper E6-b: 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 μM
- Fab-Antikörper H4-b: 5; 7,5; 9; 10; 12,5 μM

Die Messungen wurden für beide Fab-Antikörper mehrfach durchgeführt.

In einem zweiten Schritt erfolgte dann die Auswertung, diese erfolgte mittels eines Langmuir 1:1 Bindungsmodells des BIAevaluation Programms der Firma Biacore.

Im Folgenden findet sich eine graphische Gegenüberstellung der Messergebnisse am Beispiel des Fab-Antikörpers E6-b mit ausgewählten Konzentrationen:

EAA/HLA-A*0201:

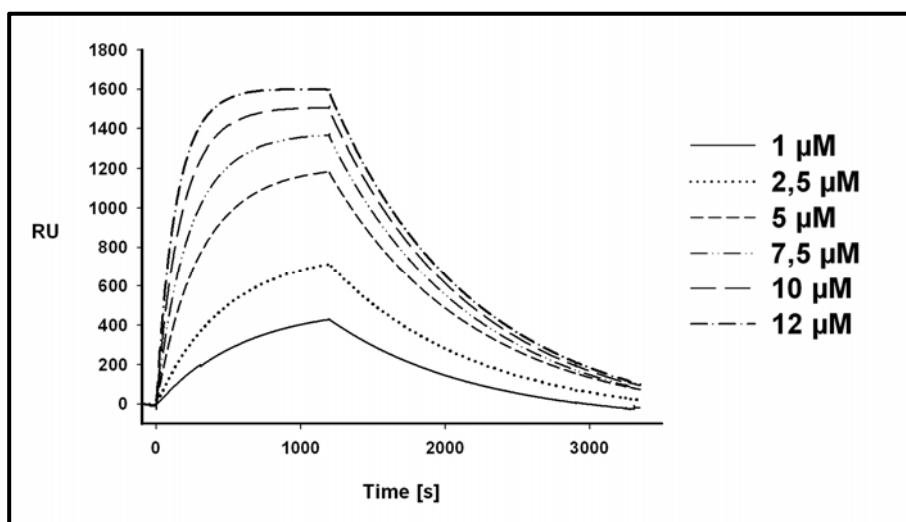


Abbildung 48: Oberflächenplasmonresonanzmessung des Fab-Antikörpers E6-b auf EAA/HLA-A*0201

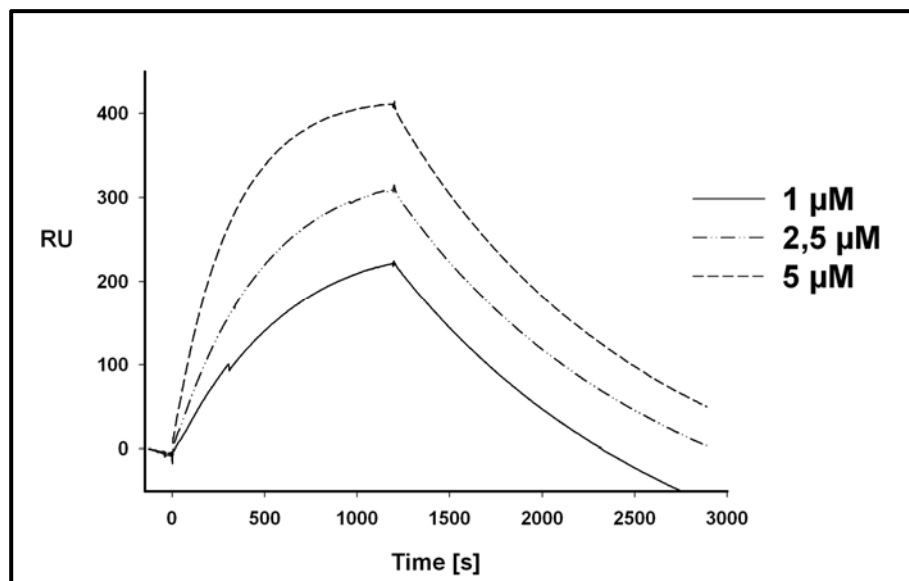
ELA/HLA-A*0201:

Abbildung 49: Oberflächenplasmonresonanzmessung des Fab-Antikörpers E6-b auf ELA/HLA-A*0201

Im Folgenden findet sich eine tabellarische Übersicht der Ergebnisse:

Tabelle 2: Ergebnisse der Kinetikmessungen mittels Oberflächenplasmonresonanz auf EAA/HLA-A*0201 und ELA/HLA-A*0201 .

Fab-Antikörper	Peptid	$k_{on} [M^{-1}s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	Halbwertszeit [s]	$K_D (k_{off}/k_{on}) [\mu M]$
E6	EAA	430 ± 23	$1,1 \pm 0,03 \cdot 10^{-3}$	640 ± 20	$2,5 \pm 0,1$
	ELA	425 ± 48	$0,9 \pm 0,04 \cdot 10^{-3}$	800 ± 4	$2,0 \pm 0,2$
H4	EAA	$7 \pm 2,6$	$2,9 \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$	235 ± 0	403 ± 189
	ELA	435 ± 150	$0,9 \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$	820 ± 374	$1,9 \pm 0,9$

Beide Fab-Antikörper wiesen eine im Vergleich mit EAA/HLA-A*0201 höhere Affinität zu ELA/HLA-A*0201 auf, was durch den geringeren Wert von K_D verdeutlicht wird. Ferner konnte man bei beiden Fab-Antikörpern bei Vergleich der *half life* auf beiden MHC-Peptid-Komplexen eine längere Halbwertszeit auf ELA/HLA-A*0201 feststellen. Dies konnte bereits zuvor mittels durchflusszytometrischer Analysen gezeigt werden.

V Diskussion

1 *Spezifität der Fab-Antikörper*

In der vorliegenden Arbeit wurden aus einer Phagemidbank Fab-Antikörper selektiert und anschließend charakterisiert, welche spezifisch MHC-Peptid-Komplexe bestehend aus einem HLA-A*0201-Molekül sowie dem Melan-A₂₆₋₃₅ EAA-Peptid zu binden vermögen. Diese Bindung geschieht in einer dem T-Zell-Rezeptor nahezu analogen Art und Weise.

Im ELISA konnte ferner gezeigt werden, dass die Fab-Antikörper nach Expression auf der Oberfläche eines Phagen nur auf solchen löslichen rekombinanten MHC-Peptid-Komplexen eine Reaktion zeigten, wenn als Antigen ein Epitop des Melan-A Proteins vorhanden war. Im Falle eines Epitops eines anderen Proteins, welches im Kontext eines HLA-A*0201-Moleküls präsentiert wurde, konnte keine Reaktivität der Fab-Antikörper nachgewiesen werden. Nach externer Beladung HLA-A*0201-positiver T2-Zellen mit einem Panel an HLA-A*0201-restringierter Epitope zeigte sich lediglich eine Reaktivität gegen das Epitop aus dem Melan-A Protein. Analog aufgebaute Analysen wurden mit HLA-A*0201-positiven EBV-immortalisierten B-Zellen durchgeführt, welche den T2-Zellen analoge Ergebnisse ergaben. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass es sich bei den beiden Fab-Antikörpern E6 und H4 um eine im Rahmen der getesteten Kontroll-Epitope spezifische Bindung handelt. Des Weiteren konnte mittels durchflusszytometrischer Analysen auf HLA-A*0201-negativen EBV-immortalisierten B-Zellen gezeigt werden, dass die Peptid-spezifische Bindung der Fab-Antikörper Allel-spezifisch ist, d.h. sie interagieren nur, wenn das Peptid im Kontext eines HLA-A*0201 Komplex präsentiert wird.

Die Analysen wurden sehr umfangreich gestaltet, um Aussagen zur Spezifität mit größtmöglicher Validität machen zu können. Es gibt immer wieder Antikörper, die zunächst als spezifisch für ein bestimmtes Antigen gelten und erst später als kreuzreagierend entlarvt werden, was die Antikörper wissenschaftlich nutzlos macht. Beispielsweise sei ein bereits kommerziell vertriebener Antikörper (Klon 01085, Roche) mit angeblicher Spezifität von fox P3 genannt. Seine fehlende Antigen-

Spezifität stellte sich erst heraus, als verschiedene Labore nicht interpretierbare Ergebnisse produzierten. Inzwischen wird der Antikörper nicht mehr vertrieben.

2 *Detektion des endogen prozessierten MHC-Peptid-Komplexes auf Tumorzellen*

Die im Rahmen dieser Arbeit selektionierten Fab-Antikörper zeigten in ersten durchflusszytometrischen Analysen eine Reaktivität gegen den endogen prozessierten und präsentierten Melan-A₂₆₋₃₅/HLA-A*0201-Komplex. Die durchflusszytometrischen Ergebnisse sollten jedoch mittels eines Blockversuches auf derselben Tumorzelllinie bestätigt werden, was nicht gelang. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass mit den beiden Fab-Antikörper E6 und H4 die auf Tumorzellen endogen prozessierten und präsentierten MHC-Peptid-Komplexe mittels der Durchflusszytometrie nicht nachgewiesen werden können.

Diese Beobachtung lässt sich durch das Phänomen erklären, dass eine Tumorzelle auf ihrer Oberfläche nur eine geringe Anzahl eines individuellen MHC-I-Peptid-Komplex präsentiert (Skipper et al., 1999). Diese Problematik wurde bereits von weiteren Arbeitsgruppen dargestellt. So konnten *Subbramanian et al.* ein virales, von SIV-entstammendes Epitop im Kontext des Mamu-A*01 Allels des Rhesusaffen nicht auf mit SIV-infizierten Zellen durch hochaffine, tetramerisierte T-Zell-Rezeptoren detektieren (Subbramanian et al., 2004). Es kommt somit nach regulärer Prozessierung und Präsentation für ein einzelnes Peptid zu einer sehr geringen Anzahl an Kopien auf der Zelloberfläche (Engelhard et al., 2002), welche weit unter der durchflusszytometrischen Nachweisgrenze liegen.

Die in dieser Arbeit vorliegenden durchflusszytometrischen Ergebnisse der Fab-Antikörper sind folglich bereits mit der geringen Anzahl an Melan-A₂₆₋₃₅/HLA-A*0201-Komplexen pro Tumorzelloberfläche erklärt.

3 *Detektion des endogen prozessierten MHC-Peptid-Komplexes auf infizierten Zellen*

Aufgrund der Tatsache, dass es mit den in dieser Arbeit selektionierten und charakterisierten Fab-Antikörper nicht gelungen ist, gegen den Melan-A₂₆₋₃₅/HLA-A*0201-Komplex nach endogener Prozessierung und Präsentation auf Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie eine spezifische Reaktivität nachzuweisen, wurden in der Folge EBV-immortalisierte B-Zellen mit rekombinanten Vaccinia-Viren infiziert. Die Plasmide kodierten entweder für das A27L-mutierte Melan-A Protein oder für das immunogene A27L-mutierte Melan-A₂₆₋₃₅ Peptid, in beiden Fällen in Form eines Fusionsproteins, mit GFP-Ubiquitin als Reporter-Protein am N-terminalen Ende. Somit kam es zu einer äquimolaren Expression von GFP-Ubiquitin auf der einen sowie des Peptids bzw. Proteins, welche für die Analysen von Interesse waren, auf der anderen Seite (Levy et al., 1996; Valmori et al., 1999; Varshavsky, 1996). Auf diese Weise konnte eine simultane Bestimmung der Effizienz der Infektion einerseits sowie der Bestimmung der Menge an GFP-Ubiquitin andererseits erfolgen.

Zur Detektion der endogen prozessierten und präsentierten ELA/HLA-A*0201-Komplexe auf der Zelloberfläche der infizierten EBV-immortalisierten B-Zellen kamen die Fab-Antikörper E6-b und H4-b zur Anwendung. Auf infizierten Zellen war eine Detektion des ELA/HLA-A*0201-Komplexes mittels Fab-Antikörper möglich. Auf den als Negativkontrolle dienenden nicht infizierten Zellen zeigte sich keine Bindung in der Durchflusszytometrie.

4 *Quantifizierung der endogenen Prozessierung und Präsentation*

Zur Quantifizierung der auf der Zelloberfläche präsentierten ELA/HLA-A*0201-Komplexe dienten standardisierte Quantifizierungsbeads. Die Anzahl der Komplexe pro Zelle bewegte sich bei den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen in einem Bereich von 50 bis 140 Komplexen pro Zelle im Fall des Melan-A A27L Proteins sowie im Bereich von 760 bis 1820 Komplexen im Fall des Melan-A₂₆₋₃₅ A27L Peptids. Mittels Westernblot konnten zudem die Anzahl der synthetisierten Melan-A A27L

Proteine bzw. Melan-A₂₆₋₃₅ A27L Peptide quantifiziert werden. Es zeigte sich, dass im Fall des Melan-A A27L insgesamt 18.000 - 25.000 Proteine intrazellulär synthetisiert werden müssen pro auf der Zelloberfläche präsentem ELA/HLA-A*0201-Komplex, im Fall des Melan-A₂₆₋₃₅ A27L müssen 1.200 - 2.600 Peptide intrazellulär synthetisiert werden.

Bislang wurden nur einige wenige Untersuchungen publiziert, die sich mit Antikörpern als Mittel der Wahl zur Quantifizierung auf natürlichem Weg prozessierter MHC-I-Peptid-Komplexen beschäftigten (Cohen et al., 2003; Porgador et al., 1997; Princiotto et al., 2003). *Porgador et. al* konnten zeigen, dass es nach Infektion von RMA-S-Zellen mit rekombinanten Vaccinia Viren zu einer deutlichen Zunahme der MHC-Peptid-Komplexen pro Zelle kommt, wenn der Vektor für das antigene Peptid anstelle des Proteins kodiert: Nach Infektion der RMA-S-Zellen mit für OVA (*chicken ovalbumin*) kodierendem Vektor können auf der Zelloberfläche etwa 4000 OVA₂₅₇₋₂₆₄/K^b-Komplexe detektiert werden. Nach Infektion mit solchen rekombinanten Vaccinia Viren, deren Vektor für das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ kodiert, steigt die Anzahl an OVA₂₅₇₋₂₆₄/K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche auf insgesamt 8500 (Porgador et al., 1997). Ähnliche Ergebnisse erzielten *Cohen et. al.* (Cohen et al., 2003): Sie selektionierten Antikörper gegen das aus HTLV-1 stammende im Kontext von HLA-A*0201 präsentierte Epitop Tax₁₁₋₁₉ und führten mittels dieser MHC-Peptid-spezifischer Antikörper eine Analyse der endogenen Prozessierung und Präsentation des Tax₁₁₋₁₉/HLA-A*0201-Komplexes durch. Nach Transfektion geeigneter APCs mit einem das Epitop kodierenden Vektor konnten pro Zelle 10⁴ Tax₁₁₋₁₉/HLA-A*0201-Komplexe detektiert werden. Die bisher umfassendste Arbeit zu diesem Thema wurde von *Princiotto et. al* (Princiotto et al., 2003) veröffentlicht: In der murinen Zelllinie L929 wurde die Expression von einem rekombinanten Vaccinia Virus kodiertem OVA und die Präsentation seines antigenen Epitops OVA₂₅₇₋₂₆₄ im Kontext des murinen H-2 K^b Komplex quantitativ untersucht. Es zeigte sich, dass es zur Präsentation eines OVA₂₅₇₋₂₆₄/K^b-Komplexes der Prozessierung und Degradation von insgesamt 500 bis 3000 Translationsprodukten der Vaccinia Viren bedarf.

Im Angesicht dieser Daten kann man davon ausgehen, dass Antigenprozessierung und -präsentation im Fall des Melan-A erheblich ineffektiver sind als die von den wenigen bisher untersuchten Epitopen.

Interessanterweise zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass die zur Infektion mit rekombinanten Vaccinia Viren verwendeten APCs, EBV-immortalisierte B-Zellen, aus dem Protein Melan-A A27L das Melan-A₂₆₋₃₅ A27L Peptid ELA prozessierten. Diese Zelllinie besitzt anstelle des Standard-Proteasoms überwiegend Immunoproteasomen (Frisan et al., 1998), von denen bekannt ist, dass diese die Melan-A Epitope weniger effizient spalten als Standard-Proteasomen (Morel et al., 2000).

Das Standard-Proteasom der Eukaryonten, bestehend aus einer 20S- und zwei 19S-Untereinheiten, zählt aufgrund seiner proteolytischen Aktivität zu den Proteasen. Die 20S-Untereinheit besteht noch aus je zwei α - und zwei β -Einheiten, jeweils in Ringform angeordnet. Die 19S-Untereinheit erkennt dabei mit Ubiquitin markierte zytosolische Proteine, so dass diese im Innern des Proteasoms degradiert werden können, ein für jede Zelle lebenswichtiger Prozess. Ein Proteasom, welches nun zusätzliche, durch IFN- γ induzierbare β -Untereinheiten besitzt, wird als Immunoproteasom bezeichnet. Diese Einheiten sind katalytisch aktiv und können die konstitutiven Einheiten im „normalen“ Proteasom ersetzen. Man nimmt an, dass im Fall einer Infektion das sezernierte IFN- γ den Austausch der Einheiten bewirkt, so dass ein Immunoproteasom entsteht. Dieses kann schließlich modulierend auf die Immunantwort einwirken. Bisher ist jedoch nicht bekannt, in welchem Verhältnis Standard-Proteasom und Immunoproteasom in EBV-transformierten B-Zellen stehen, so dass die Prozessierung auch durch die ständig vorhandene basale Aktivität des Standard-Proteasoms erklärt werden könnte.

Die Bildung eines MHC-Peptid-Komplexes ist weniger von der absoluten Menge des ursprünglichen Proteins als vielmehr von seiner Syntheserate und intrazellulären Halbwertszeit abhängig (Khan et al., 2001; Reits et al., 2000; Schubert et al., 2000). Es kann als Konsequenz dessen davon ausgegangen werden, dass die im Rahmen der Infektion der APCs mit rekombinanten Vaccinia Viren deutlich gesteigerten intrazellulären Syntheserate die Realität in Melanomzellen oder Melanozyten nicht ganz widerspiegelt. Dies begründet sich ferner durch die Tatsache, dass es *in vivo* zu einer Akkumulation der Proteine im trans-Golgi Netzwerk, in Endosomen, Melanosomen sowie in Plasmamembranen kommt (De Maziere et al., 2002). Es bedarf folglich einer Analyse und Quantifizierung der Proteinexpression, -prozessierung sowie -präsentation in einer nicht manipulierten Melanomzelle, was sich zum gegenwärti-

gen Zeitpunkt nicht zuletzt aufgrund der sehr geringen Kopienzahl an MHC-Peptid-Komplexen auf der Zelloberfläche als sehr schwierig erweist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass es sich bei der Antigenprozessierung um einen außergewöhnlich ineffizienten Prozess handelt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt geht man von mehreren Mechanismen aus, die dafür verantwortlich zu sein scheinen. Die Antigenprozessierung und -präsentation stellt sicher kein Prozess dar, der ungestört, Schritt für Schritt, vergleichbar der Fließbandarbeit, abläuft. So wird ein translatiertes Protein weiterer Bearbeitungsschritte unterzogen, welche u.a. im Proteasom statt finden. Im Anschluss erhalten die aus dem Proteasom freigesetzten Peptide Zugang zu zytosolischen Peptidasen, welche in der Lage sind, innerhalb kürzester Zeit eine große Anzahl an Peptiden zu degradieren (Reits et al., 2003). Diejenigen Peptide, die nicht degradiert wurden, müssen anschließend in das ER transportiert werden, was in der Regel mittels TAP-Proteinen geschieht (Neefjes et al., 1993). Diese sind assoziiert mit dem sogenannten *MHC class I loading complex*, der von den Chaperonen Calreticulin, Erp57 sowie Tapasin gebildet wird (Ortmann et al., 1997). Solche Peptide, welche aufgrund ihrer Länge nicht in die Antigenbindungsstelle des MHC-I-Moleküls passen, werden gegebenenfalls einem weiteren Bearbeitungsschritt unterzogen: Peptidasen im ER schneiden ein Stück des Peptides vom N-terminalen Ende ab (Saric et al., 2002; Serwold et al., 2002). Anschließend kann der korrekt gefaltete MHC-Peptid-Komplex zur Zelloberfläche transportiert werden. Alle genannten Mechanismen tragen dazu bei, dass es nach Translation eines Proteins zur Präsentation eines Epitops auf der Zelloberfläche kommen kann. Somit kann jeder Mechanismus einen Teil zur Ineffizienz der MHC-I-Präsentation von Antigenen, in diesem Fall der Epitope des Melan-A Proteins, beitragen.

Es ist sicherlich von großem Interesse, denjenigen Schritt der Kaskade zu identifizieren, der den größten Beitrag zur Ineffizienz leistet. Hierfür bedarf es weiterer umfangreicher Untersuchungen.

5 **Änderung der Immunogenität durch A27L-Substitution im Melan-A**

Modifikationen der Sequenz von natürlich vorkommenden MHC-Klasse-I restringierter Epitope wurden bereits vielfach durchgeführt. Ein Teil dieser modifizierten Epitope sind deutlich immunogener als es deren Wildtyp ist. Eine Erklärungsmöglichkeit für das Phänomen ist, dass spezifische T-Zell Rezeptoren mit dem modifizierten Epitop mit höherer Affinität interagieren, es somit zu einer weitaus effizienteren Erkennung durch diese T-Zellen kommt, was sich letztlich in einer gesteigerten Reaktivität von Melan-A₂₆₋₃₅ A27L ELA äußert (Valmori et al., 1998; Valmori et al., 2000). Die höhere Immunogenität lässt sich nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* beobachten. Im Rahmen von Vakzinierungsstudien führte die Immunisierung von Tumorpatienten mit modifizierten Epitopen natürlich vorkommender Tumorantigene, sogenannten *altered peptide ligands*, kurz APL, zu einer gesteigerten Expansion spezifischer zytotoxischer T-Zellen (Rosenberg et al., 1998).

Nichtsdestoweniger stimmen nicht alle experimentell Daten mit dem Konzept überein, dass eine höhere Affinität eines T-Zell Rezeptors zum MHC-Peptid-Komplex mit einer höheren T-Zell Aktivierung einhergeht (Weber et al., 2005).

Die mittels Phage Display selektierten Fab-Antikörper E6 und H4 zeigten sowohl im ELISA als auch in durchflusszytometrischen Analysen eine konstante Reaktivität gegen das Melan-A₂₆₋₃₅ Peptid einerseits sowie gegen das Melan-A₂₆₋₃₅ A27L Peptid andererseits. Diese Tatsache eröffnet die Möglichkeit, den Einfluss der A27L-Substitution auf die Bindungskinetik von T-Zell-Rezeptoren oder deren ähnliche Moleküle an einen MHC-Peptid-Komplex zu untersuchen.

In allen durchgeführten Analysen interagierten die beiden Fab-Antikörper E6 und H4 mit höherer Affinität gegen die immunogenere Peptidvariante Melan-A₂₆₋₃₅ A27L als gegen das weniger immunogenere Melan-A₂₆₋₃₅. Diese beruht, wie sich in den Oberflächenplasmonresonanzmessungen zeigte, im Fall des Fab-Antikörpers E6 in einer im Vergleich zum EAA/HLA-A*0201-Komplex deutlich geringeren Dissoziationsrate, wohingegen im Fall des Fab-Antikörpers H4 die gesteigerte Assoziationsrate den Ausschlag gibt.

Wie lässt sich die Tatsache, dass es nach A27L-Substitution im Melan-A zu einer höheren Affinität der Fab-Antikörper kommt, erklären? Durch die A27L-Substitution kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Alanin gegen Leucin an Position 27 im Melan-A Protein. Betrachtet man die Seitenketten der beiden Aminosäuren, so kann man vermuten, dass die Seitenkette von Alanin weniger gut in die bekanntermaßen hydrophobe Bindungsfurche des HLA-A*0201-Komplexes passt als die der Aminosäure Leucin. Ferner tragen die beiden Glycine, welche sich in der Mitte des Peptids befinden, zusätzlich zur Instabilität der EAA/HLA-A*0201 Komplexes bei. Folglich ist die zur Stabilisierung des MHC-Peptid-Komplexes notwendige Entropie weitaus höher als im Fall des ELA/HLA-A*0201-Komplexes. Dass es nach A27L-Substitution zu einer deutlich gesteigerten Stabilität des MHC-Peptid-Komplexes kommt, zeigte sich anhand der um den Faktor 10 gesteigerten Halbwertszeit des Melan-A₂₆₋₃₅ A27L Peptids nach exogener Beladung von APC, verglichen mit der des Melan-A₂₆₋₃₅ Peptids.

Auch im Fall anderer MHC-restringierter Epitope sind APL identifiziert worden, welche eine gesteigerte Immunogenität aufweisen, beispielsweise für das im Kontext von H-2L^d präsentierte Peptid gp100 (Overwijk et al., 1998) oder für das im Kontext von HLA-A*0201 präsentierte Peptid NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (Chen et al., 2005). *Chen et al.* konnten bereits zuvor zeigen, dass die C165V-Substitution im NY-ESO-1 Protein *in vitro* zu einer gesteigerten Reaktivität NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ spezifischer zytotoxischer T-Zellen führt (Chen et al., 2000), obwohl bekannt ist, dass Cysteinilierung eines mittels MHC-I-Moleküls präsentierten Peptids dessen antigene Eigenschaften reduzieren kann (Chen et al., 1999). Die Substitution am COOH-terminalen Ende des NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ führt dazu, dass das Peptid geringfügig tiefer in der Bindungsfurche des HLA-A*0201-Moleküls zu liegen kommt. Diese wenn auch nur geringfügigen Änderungen der Interaktion zwischen MHC-Peptid-Komplex und T-Zell-Rezeptor scheinen auszureichen, um die Kinetik der Interaktion signifikant zu beeinflussen. Oberflächenplasmonresonanzmessungen ergaben, dass spezifische rekombinante T-Zell-Rezeptoren den MHC-Peptid-Komplex nach C165V-Substitution mit höherer Affinität binden. Eine Affinitätssteigerung wurde durch eine Abnahme der Dissoziation des rekombinanten T-Zell-Rezeptors vom MHC-Peptid-Komplex erzielt (Chen et al., 2005). *Overwijk et al.* kommen in ihrer Arbeit zu der Annahme, dass eine Abnahme

der Dissoziationsrate für die letztlich gesteigerte Affinität verantwortlich zu sein scheint (Overwijk et al., 1998).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor und dem MHC-Peptid-Komplex das initiale Ereignis der Erkennung des Antigens mit konsekutiver T-Zell-Aktivierung darstellt. Diese erste Interaktion ist ein hoch spezifischer Vorgang, der sehr empfindlich auf Änderungen jedweder Art reagiert. Beispielsweise kann der Austausch einer einzelnen Aminosäure im antigenen Peptid eine nahezu vollständige Änderung der Signalkaskade hervorrufen (Germain, 2003). In Anbetracht dieser Tatsache, können APL bezogen die T-Zell-Aktivierung volle Agonisten, partielle Agonisten oder auch Antagonisten darstellen.

Die erhöhte Stabilität des ELA/HLA-A*0201-Komplexes vermag nur bedingt die effizientere T-Zell-Aktivierung zu erklären. Mit einer Vielzahl an verschiedenen Modellen wurde der Versuch unternommen, dieses Phänomen einer durch einen APL gesteigerten T-Zell-Aktivierung zu erklären. Beispielsweise muss laut Kinetikuntersuchungen ein T-Zell-Rezeptor ausreichend lange an einen MHC-Peptid-Komplex binden, um eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen zu können. Dies würde bedeuten, dass eine nur sehr kurze Interaktionszeit des MHC-Peptid-Komplex mit dem T-Zell-Rezeptor weniger effizient wäre als eine längere (McKeithan, 1995). Weiterführende Untersuchungen dieses Modells suggerieren, dass die Interaktion zwischen einem MHC-Peptid-Komplex und dem jeweiligen T-Zell-Rezeptor in einem gewissen Zeitfenster liegen muss, also auch nicht zu lange sein darf, so dass mehrere T-Zell-Rezeptoren einer Zelle seriell an einen MHC-Peptid-Komplex binden können (Valitutti et al., 1995). Demzufolge müsste eine optimale Interaktionszeit (*dwelt-time*) vorliegen, um eine optimale T-Zell-Aktivierung zu induzieren. Eine langsamere Dissoziation und folglich längere Interaktion würde folglich weniger T-Zell-Rezeptoren innerhalb der immunologischen Synapse die Interaktion mit dem MHC-Peptid-Komplex erlauben (Kalergis et al., 2001). Dadurch kann die intrazellulär ausgelöste Signalkaskade unterhalb der Schwelle einer T-Zell-Aktivierung bleiben.

Betrachtet man jedoch die Tatsache, dass mutierte T-Zell-Rezeptoren mit einer 15- bis 45-fach langsameren Dissoziation von ihrem MHC-Peptid-Komplex *in-vitro* bei einer definierten Peptidkonzentration die gleiche Reaktivität zeigen wie der native T-Zell-Rezeptor (Holler et al., 2001; Weber et al., 2005), wirft das soeben beschriebene Modell eine Vielzahl an bislang unbeantworteten Fragen auf.

Eine zusätzliche kritische Betrachtung der Daten muss insofern erfolgen, als jegliche Analysen mit T-Zell-Rezeptoren, T-Zellen oder auch Fab-Antikörpern *in vitro* erfolgten, so dass man letztlich nur Hinweise darauf gewinnt, in wie weit die Generierung von APL einen systematischen Einfluss auf die Interaktionen zwischen T-Zellen und das potentiell immunogenere Peptid präsentierende MHC-Peptid-Komplexen *in vivo* hat.

6 **Perspektiven**

Die von uns generierten und charakterisierten MHC-Peptid-spezifischen Antikörper stellen eine erhebliche Erweiterung des Instrumentariums zur Bearbeitung von Fragestellungen der Antigenprozessierung und –präsentation dar. Dies gilt sowohl für Untersuchungen der Immunantwort im physiologischen Kontext, als auch unter pathologischen Bedingungen wie zum Beispiel in der Tumورimmunologie. So kommt es nur sehr selten zu einer Zerstörung eines manifesten Tumors durch das Abwehrsystem des Patienten, obwohl inzwischen eine Vielzahl an tumorspezifischen Antigenen identifiziert worden sind, die sehr wohl T-Zell- (Van den Eynde & van der Bruggen, 1997) sowie B-Zell-Antworten (Preuss et al., 2002) hervorrufen. Neben potentiell ineffektiven Effektormechanismen stellen *tumor escape* Mechanismen ein inzwischen gut fundiertes Erklärungsmodell dar. So kann eine Reduktion oder gar der Verlust der Expression von MHC-I-Molekülen auftreten (Romero et al., 2005; Serrano et al., 2001). Ferner kann es trotz normaler MHC-I-Expression innerhalb einer Zelle zu einem Verlust der Präsentation einzelner T-Zell-Epitope kommen, während die Präsentation anderer erhalten bleibt. Held et. al. (Held et al., 2008) stellten dies in ihrer Arbeit dar am Beispiel der SSX-Familie, einer Gruppe von sogenannten Cancer-Testis-Antigenen (kurz CT-Antigene). Unter Anwendung von MHC-Peptid-spezifischen Fab-Antikörpern demonstrierten sie, dass es in verschiedenen Tumorzelllinien zu unterschiedlich starker, zum Teil völlig fehlender Präsentation des HLA-A*0201-restringierten Epitops SSX2₁₀₃₋₁₁₁ kommt, während SSX2₄₁₋₄₉ als ein weiteres vom identischen Protein entstammendes Epitop homogen präsentiert wird. Der Mechanismus des *tumor escape* kann somit auch einzelne Epitope einer Tumorzelle betreffen. Dies kann insofern Bedeutung gewinnen, als neue therapeutische Strategien darauf abzielen könnten, gezielt das Repertoire präsentierter Epitope auf Tumorzell-

len zu vergrößern und damit die Lyseraten durch zytotoxische T-Zellen zu steigern. Im Falle des malignen Melanoms ist eine Ineffektive Präsentation sehr wahrscheinlich. Dieser Tumor wird oft von T-Zellen infiltriert, ohne dass es zu einer nennenswerten Lyse von malignen Zellen kommt. Die von uns generierten Antikörper werden zu detaillierten Untersuchung dieses Phänomens eingesetzt werden.

Neben den eher grundlagenwissenschaftlichen Anwendungen könnten MHC-Peptid-spezifische Antikörper therapeutisch zur Anwendung kommen. Die Antikörper detektieren ein zugängliches, sich auf der Zelloberfläche befindendes Antigen. Als Fusionsprotein können MHC-Peptid-spezifische Fab-Antikörper beispielsweise gekoppelt mit einem Exotoxin aus *Pseudomonas aeruginosa* bereits erfolgreich in einem Mausmodell eingesetzt worden. *Klechevsky et. al.* (Klechevsky et al., 2008) generierten auf der Basis MHC-Peptid-spezifischer Fab-Antikörper eine „neue“ Antikörperklasse, sogenannte Immunotoxine, welche sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Mausmodell zur Tumorregression führten. Dazu generierten sie aus MART-1₂₆₋₃₇-spezifischen Fab-Antikörpern ein Fusionsprodukt mit dem verkürzten Exotoxin aus *Pseudomonas aeruginosa*. Das Fusionsprodukt, ein sogenanntes Immunotoxin, hatte somit die Bindungseigenschaften des Fab-Antikörpers sowie die Toxineigenschaften des Exotoxins und konnte daher nach spezifischer Bindung an Melanomzellen internalisiert werden und schließlich zum Zelltod führen. Dies zeigten *Klechevsky et. al.* *in vitro* mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie Nachweis der Hemmung der Proteinsynthese. *In vivo* konnte die Wirksamkeit des Immunotoxins mittels Mausmodell an bestrahlten NOD-SCID $\beta 2m$ -defizienten Mäusen gezeigt werden. Es kam zu einer dosisabhängigen Abnahme des Tumorumfanges um bis zu 75% des Ausgangsvolumens.

Zusammengefasst stellen die von uns generierten und charakterisierten Antikörper Reagenzien mit exklusiver Spezifität dar, mit denen drängende tumorimmunologische Fragestellungen zukünftig bearbeitet werden können. Ihre Relevanz wird durch einen potentiellen therapeutischen Einsatz weiter gesteigert.

VI Literaturverzeichnis

- Ackerman, A.L. & Cresswell, P. (2004). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol*, **5**, 678-84.
- Andersen, P.S., Stryhn, A., Hansen, B.E., Fugger, L., Engberg, J. & Buus, S. (1996). A recombinant antibody with the antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1820-4.
- Aptsiauri, N., Cabrera, T., Mendez, R., Garcia-Lora, A., Ruiz-Cabello, F. & Garrido, F. (2007). Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression. *Adv Exp Med Biol*, **601**, 123-31.
- Bakker, A.B., van der Burg, S.H., Huijbens, R.J., Drijfhout, J.W., Melief, C.J., Adema, G.J. & Figdor, C.G. (1997). Analogues of CTL epitopes with improved MHC class-I binding capacity elicit anti-melanoma CTL recognizing the wild-type epitope. *Int J Cancer*, **70**, 302-9.
- Bowman, T., Broome, M.A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W.J., Sedivy, J.M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S.A. & Jove, R. (2001). Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7319-24.
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J. & Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene*, **19**, 2474-88.
- Breitling, F., Dübel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I. & Little, M. (1991). A surface expression vector for antibody screening. *Gene*, **104**, 147-53.
- Buettner, R., Mora, L.B. & Jove, R. (2002). Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res*, **8**, 945-54.

- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, **112**, 195-203.
- Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A.F., Rock, K.L. & Goldberg, A.L. (2001). 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *Embo J*, **20**, 2357-66.
- Castelli, C., Storkus, W.J., Maeurer, M.J., Martin, D.M., Huang, E.C., Pramanik, B.N., Nagabhushan, T.L., Parmiani, G. & Lotze, M.T. (1995). Mass spectrometric identification of a naturally processed melanoma peptide recognized by CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, **181**, 363-8.
- Catipovic, B., Talluri, G., Oh, J., Wei, T., Su, X.M., Johansen, T.E., Edidin, M. & Schneck, J.P. (1994). Analysis of the structure of empty and peptide-loaded major histocompatibility complex molecules at the cell surface. *J Exp Med*, **180**, 1753-61.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., Dalton, W.S. & Jove, R. (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, **10**, 105-15.
- Chaga, G., Bochkariov, D.E., Jokhadze, G.G., Hopp, J. & Nelson, P. (1999). Natural poly-histidine affinity tag for purification of recombinant proteins on cobalt(II)-carboxymethylaspartate crosslinked agarose. *J Chromatogr A*, **864**, 247-56.
- Chames, P., Hufton, S.E., Coulie, P.G., Uchanska-Ziegler, B. & Hoogenboom, H.R. (2000). Direct selection of a human antibody fragment directed against the tumor T-cell epitope HLA-A1-MAGE-A1 from a nonimmunized phage-Fab library. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7969-74.

- Chapatte, L., Servis, C., Valmori, D., Burlet-Schiltz, O., Dayer, J., Monsarrat, B., Romero, P. & Levy, F. (2004). Final antigenic Melan-A peptides produced directly by the proteasomes are preferentially selected for presentation by HLA-A*0201 in melanoma cells. *J Immunol*, **173**, 6033-40.
- Chen, J.L., Dunbar, P.R., Gileadi, U., Jager, E., Gnjjatic, S., Nagata, Y., Stockert, E., Panicali, D.L., Chen, Y.T., Knuth, A., Old, L.J. & Cerundolo, V. (2000). Identification of NY-ESO-1 peptide analogues capable of improved stimulation of tumor-reactive CTL. *J Immunol*, **165**, 948-55.
- Chen, J.L., Stewart-Jones, G., Bossi, G., Lissin, N.M., Wooldridge, L., Choi, E.M., Held, G., Dunbar, P.R., Esnouf, R.M., Sami, M., Boulter, J.M., Rizkallah, P., Renner, C., Sewell, A., van der Merwe, P.A., Jakobsen, B.K., Griffiths, G., Jones, E.Y. & Cerundolo, V. (2005). Structural and kinetic basis for heightened immunogenicity of T cell vaccines. *J Exp Med*, **201**, 1243-55.
- Chen, P.J., Yeh, S.H. & Chen, D.S. (1994). Alleles lost and gained in malignant cells. *N Engl J Med*, **331**, 1591-2.
- Chen, W., Yewdell, J.W., Levine, R.L. & Bennink, J.R. (1999). Modification of cysteine residues in vitro and in vivo affects the immunogenicity and antigenicity of major histocompatibility complex class I-restricted viral determinants. *J Exp Med*, **189**, 1757-64.
- Cheng, F., Wang, H.W., Cuenca, A., Huang, M., Ghansah, T., Brayer, J., Kerr, W.G., Takeda, K., Akira, S., Schoenberger, S.P., Yu, H., Jove, R. & Sotomayor, E.M. (2003). A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity*, **19**, 425-36.
- Cohen, C.J., Sarig, O., Yamano, Y., Tomaru, U., Jacobson, S. & Reiter, Y. (2003). Direct phenotypic analysis of human MHC class I antigen presentation: visualization, quantitation, and in situ detection of human viral epitopes using peptide-specific, MHC-restricted human recombinant antibodies. *J Immunol*, **170**, 4349-61.

- Collins, E.J. & Frelinger, J.A. (1998). Altered peptide ligand design: altering immune responses to class I MHC/peptide complexes. *Immunol Rev*, **163**, 151-60.
- Cormier, J.N., Salgaller, M.L., Prevette, T., Barracchini, K.C., Rivoltini, L., Restifo, N.P., Rosenberg, S.A. & Marincola, F.M. (1997). Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A. *Cancer J Sci Am*, **3**, 37-44.
- Coulie, P.G., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J.P., Renauld, J.C. & Boon, T. (1994). A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*, **180**, 35-42.
- Cromme, F.V., Airey, J., Heemels, M.T., Ploegh, H.L., Keating, P.J., Stern, P.L., Meijer, C.J. & Walboomers, J.M. (1994). Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J Exp Med*, **179**, 335-40.
- de Haard, H.J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S.E., Roovers, R.C., Henderikx, P., de Bruine, A.P., Arends, J.W. & Hoogenboom, H.R. (1999). A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J Biol Chem*, **274**, 18218-30.
- De Maziere, A.M., Muehlethaler, K., van Donselaar, E., Salvi, S., Davoust, J., Cerottini, J.C., Levy, F., Slot, J.W. & Rimoldi, D. (2002). The melanocytic protein Melan-A/MART-1 has a subcellular localization distinct from typical melanosomal proteins. *Traffic*, **3**, 678-93.
- Desjardins, M. (2003). ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol*, **3**, 280-91.
- Dodd, A.T., Morelli, J., Mokrohisky, S.T., Asdigian, N., Byers, T.E. & Crane, L.A. (2007). Melanocytic nevi and sun exposure in a cohort of colorado children: anatomic distribution and site-specific sunburn. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **16**, 2136-43.

- Engelhard, V.H., Brickner, A.G. & Zarling, A.L. (2002). Insights into antigen processing gained by direct analysis of the naturally processed class I MHC associated peptide repertoire. *Mol Immunol*, **39**, 127-37.
- Epling-Burnette, P.K., Liu, J.H., Catlett-Falcone, R., Turkson, J., Oshiro, M., Kothapalli, R., Li, Y., Wang, J.M., Yang-Yen, H.F., Karras, J., Jove, R. & Loughran, T.P., Jr. (2001). Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest*, **107**, 351-62.
- Fremont, D.H., Matsumura, M., Stura, E.A., Peterson, P.A. & Wilson, I.A. (1992). Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. *Science*, **257**, 919-27.
- Frisan, T., Levitsky, V., Polack, A. & Masucci, M.G. (1998). Phenotype-dependent differences in proteasome subunit composition and cleavage specificity in B cell lines. *J Immunol*, **160**, 3281-9.
- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J. & Desjardins, M. (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell*, **110**, 119-31.
- Gangadharan, D. & Cheroutre, H. (2004). The CD8 isoform CD8alphaalpha is not a functional homologue of the TCR co-receptor CD8alphabeta. *Curr Opin Immunol*, **16**, 264-70.
- Gao, G.F., Tormo, J., Gerth, U.C., Wyer, J.R., McMichael, A.J., Stuart, D.I., Bell, J.I., Jones, E.Y. & Jakobsen, B.K. (1997). Crystal structure of the complex between human CD8alpha(alpha) and HLA-A2. *Nature*, **387**, 630-4.
- Garcia, K.C., Degano, M., Stanfield, R.L., Brunmark, A., Jackson, M.R., Peterson, P.A., Teyton, L. & Wilson, I.A. (1996). An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science*, **274**, 209-19.

- Germain, R.N. (2003). Ligand-dependent regulation of T cell development and activation. *Immunol Res*, **27**, 277-86.
- Grawunder, U., West, R.B. & Lieber, M.R. (1998). Antigen receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol*, **10**, 172-80.
- Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P. & Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*, **425**, 397-402.
- Held, G., Neumann, F., Sturm, C., Kaestner, L., Dauth, N., de Bruijn, D.R., Renner, C., Lipp, P. & Pfreundschuh, M. (2008). Differential presentation of tumor antigen-derived epitopes by MHC-class I and antigen-positive tumor cells. *Int J Cancer*, **123**, 1841-7.
- Holler, P.D., Lim, A.R., Cho, B.K., Rund, L.A. & Kranz, D.M. (2001). CD8(-) T cell transfectants that express a high affinity T cell receptor exhibit enhanced peptide-dependent activation. *J Exp Med*, **194**, 1043-52.
- Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P. & Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res*, **19**, 4133-7.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D. & Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*, **425**, 402-6.
- Hoyer-Hansen, G., Hamers, M.J., Pedersen, A.N., Nielsen, H.J., Brunner, N., Dano, K. & Stephens, R.W. (2000). Loss of ELISA specificity due to biotinylation of monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*, **235**, 91-9.

- Huse, W.D., Sastry, L., Iverson, S.A., Kang, A.S., Alting-Mees, M., Burton, D.R., Benkovic, S.J. & Lerner, R.A. (1989). Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science*, **246**, 1275-81.
- Irvine, D.J., Purbhoo, M.A., Krogsgaard, M. & Davis, M.M. (2002). Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature*, **419**, 845-9.
- Ivanov, V.S., Suvorova, Z.K., Tchikin, L.D., Kozhich, A.T. & Ivanov, V.T. (1992). Effective method for synthetic peptide immobilization that increases the sensitivity and specificity of ELISA procedures. *J Immunol Methods*, **153**, 229-33.
- Jaeger, E., Bernhard, H., Romero, P., Ringhoffer, M., Arand, M., Karbach, J., Ilse-mann, C., Hagedorn, M. & Knuth, A. (1996). Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. *Int J Cancer*, **66**, 162-9.
- Johansen, T.E., McCullough, K., Catipovic, B., Su, X.M., Amzel, M. & Schneck, J.P. (1997). Peptide binding to MHC class I is determined by individual pockets in the binding groove. *Scand J Immunol*, **46**, 137-46.
- Kalergis, A.M., Boucheron, N., Doucey, M.A., Palmieri, E., Goyarts, E.C., Vegh, Z., Luescher, I.F. & Nathenson, S.G. (2001). Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nat Immunol*, **2**, 229-34.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C.H., Robbins, P.F., Rivoltini, L., Topalian, S.L., Miki, T. & Rosenberg, S.A. (1994a). Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3515-9.

- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C.H., Robbins, P.F., Sakaguchi, K., Appella, E., Yannelli, J.R., Adema, G.J., Miki, T. & Rosenberg, S.A. (1994b). Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6458-62.
- Kern, P.S., Teng, M.K., Smolyar, A., Liu, J.H., Liu, J., Hussey, R.E., Spoerl, R., Chang, H.C., Reinherz, E.L. & Wang, J.H. (1998). Structural basis of CD8 co-receptor function revealed by crystallographic analysis of a murine CD8alphaalpha ectodomain fragment in complex with H-2Kb. *Immunity*, **9**, 519-30.
- Khan, S., de Giuli, R., Schmidtke, G., Bruns, M., Buchmeier, M., van den Broek, M. & Groettrup, M. (2001). Cutting edge: neosynthesis is required for the presentation of a T cell epitope from a long-lived viral protein. *J Immunol*, **167**, 4801-4.
- Kim, K.S., Sun, Z.Y., Wagner, G. & Reinherz, E.L. (2000). Heterodimeric CD3epsilongamma extracellular domain fragments: production, purification and structural analysis. *J Mol Biol*, **302**, 899-916.
- King, J. & Laemmli, U.K. (1971). Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J Mol Biol*, **62**, 465-77.
- Klechevsky, E., Gallegos, M., Denkberg, G., Palucka, K., Banchereau, J., Cohen, C. & Reiter, Y. (2008). Antitumor activity of immunotoxins with T-cell receptor-like specificity against human melanoma xenografts. *Cancer Res*, **68**, 6360-7.
- Koopman, L.A., Corver, W.E., van der Slik, A.R., Giphart, M.J. & Fleuren, G.J. (2000). Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med*, **191**, 961-76.
- Koopman, L.A., van Der Slik, A.R., Giphart, M.J. & Fleuren, G.J. (1999). Human leukocyte antigen class I gene mutations in cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 1669-77.

- Koopmann, J.O., Albring, J., Huter, E., Bulbuc, N., Spee, P., Neefjes, J., Hammerling, G.J. & Momburg, F. (2000). Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity*, **13**, 117-27.
- Korkolopoulou, P., Kaklamanis, L., Pezzella, F., Harris, A.L. & Gatter, K.C. (1996). Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer*, **73**, 148-53.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lammert, E., Stevanovic, S., Brunner, J., Rammensee, H.G. & Schild, H. (1997). Protein disulfide isomerase is the dominant acceptor for peptides translocated into the endoplasmic reticulum. *Eur J Immunol*, **27**, 1685-90.
- Lederberg, E.M. & Cohen, S.N. (1974). Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol*, **119**, 1072-4.
- Levy, F., Johnsson, N., Rumenapf, T. & Varshavsky, A. (1996). Using ubiquitin to follow the metabolic fate of a protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4907-12.
- Li, S., Paulsson, K.M., Chen, S., Sjogren, H.O. & Wang, P. (2000). Tapasin is required for efficient peptide binding to transporter associated with antigen processing. *J Biol Chem*, **275**, 1581-6.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D. & Winter, G. (1992). Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system. *J Biol Chem*, **267**, 16007-10.
- McKeithan, T.W. (1995). Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5042-6.

- Men, Y., Miconnet, I., Valmori, D., Rimoldi, D., Cerottini, J.C. & Romero, P. (1999). Assessment of immunogenicity of human Melan-A peptide analogues in HLA-A*0201/Kb transgenic mice. *J Immunol*, **162**, 3566-73.
- Momburg, F., Roelse, J., Hammerling, G.J. & Neefjes, J.J. (1994). Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J Exp Med*, **179**, 1613-23.
- Morel, S., Levy, F., Burlet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Keppler, M., Peitrequin, A.L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J.C., Boon, T., Gairin, J.E. & Van den Eynde, B.J. (2000). Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity*, **12**, 107-17.
- Neefjes, J.J., Momburg, F. & Hammerling, G.J. (1993). Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*, **261**, 769-71.
- Niedermann, G., Geier, E., Lucchiari-Hartz, M., Hitziger, N., Ramsperger, A. & Eichmann, K. (1999). The specificity of proteasomes: impact on MHC class I processing and presentation of antigens. *Immunol Rev*, **172**, 29-48.
- Niu, G., Heller, R., Catlett-Falcone, R., Coppola, D., Jaroszeski, M., Dalton, W., Jove, R. & Yu, H. (1999). Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res*, **59**, 5059-63.
- Ortmann, B., Copeman, J., Lehner, P.J., Sadasivan, B., Herberg, J.A., Grandea, A.G., Riddell, S.R., Tampe, R., Spies, T., Trowsdale, J. & Cresswell, P. (1997). A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science*, **277**, 1306-9.
- Osterlind, A. (1993). Cancer and UV-radiation. *Pharmacol Toxicol*, **72 Suppl 1**, 67-8.

- Overwijk, W.W., Tsung, A., Irvine, K.R., Parkhurst, M.R., Goletz, T.J., Tsung, K., Carroll, M.W., Liu, C., Moss, B., Rosenberg, S.A. & Restifo, N.P. (1998). gp100/pmel 17 is a murine tumor rejection antigen: induction of "self"-reactive, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand. *J Exp Med*, **188**, 277-86.
- Pamer, E. & Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol*, **16**, 323-58.
- Parham, P. & Brodsky, F.M. (1981). Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28. *Hum Immunol*, **3**, 277-99.
- Parkhurst, M.R., Salgaller, M.L., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Rosenberg, S.A. & Kawakami, Y. (1996). Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J Immunol*, **157**, 2539-48.
- Porath, J. (1992). Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif*, **3**, 263-81.
- Porgador, A., Yewdell, J.W., Deng, Y., Bennink, J.R. & Germain, R.N. (1997). Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity*, **6**, 715-26.
- Preuss, K.D., Zwick, C., Bormann, C., Neumann, F. & Pfreundschuh, M. (2002). Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. *Immunol Rev*, **188**, 43-50.
- Princiotta, M.F., Finzi, D., Qian, S.B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgereit, F., Bennink, J.R. & Yewdell, J.W. (2003). Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity*, **18**, 343-54.

- Purbhoo, M.A., Irvine, D.J., Huppa, J.B. & Davis, M.M. (2004). T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol*, **5**, 524-30.
- Reinherz, E.L., Tan, K., Tang, L., Kern, P., Liu, J., Xiong, Y., Hussey, R.E., Smolyar, A., Hare, B., Zhang, R., Joachimiak, A., Chang, H.C., Wagner, G. & Wang, J. (1999). The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science*, **286**, 1913-21.
- Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., van Veelen, P., Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J.W. & Neefjes, J. (2003). Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity*, **18**, 97-108.
- Reits, E.A., Vos, J.C., Gromme, M. & Neefjes, J. (2000). The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature*, **404**, 774-8.
- Rhodes, A.R., Harrist, T.J., Day, C.L., Mihm, M.C., Jr., Fitzpatrick, T.B. & Sober, A.J. (1983). Dysplastic melanocytic nevi in histologic association with 234 primary cutaneous melanomas. *J Am Acad Dermatol*, **9**, 563-74.
- Rhodes, A.R., Sober, A.J., Day, C.L., Melski, J.W., Harrist, T.J., Mihm, M.C., Jr. & Fitzpatrick, T.B. (1982). The malignant potential of small congenital nevocellular nevi. An estimate of association based on a histologic study of 234 primary cutaneous melanomas. *J Am Acad Dermatol*, **6**, 230-41.
- Rimoldi, D., Muehlethaler, K., Salvi, S., Valmori, D., Romero, P., Cerottini, J.C. & Levy, F. (2001). Subcellular localization of the melanoma-associated protein Melan-AMART-1 influences the processing of its HLA-A2-restricted epitope. *J Biol Chem*, **276**, 43189-96.
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. & Amigorena, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol*, **1**, 362-8.

- Romero, J.M., Jimenez, P., Cabrera, T., Cozar, J.M., Pedrinaci, S., Tallada, M., Garrido, F. & Ruiz-Cabello, F. (2005). Coordinated downregulation of the antigen presentation machinery and HLA class I/beta2-microglobulin complex is responsible for HLA-ABC loss in bladder cancer. *Int J Cancer*, **113**, 605-10.
- Romero, P. (1996). Cytolytic T lymphocyte responses of cancer patients to tumor-associated antigens. *Springer Semin Immunopathol*, **18**, 185-98.
- Romero, P., Gervois, N., Schneider, J., Escobar, P., Valmori, D., Pannetier, C., Steinle, A., Wolfel, T., Lienard, D., Brichard, V., van Pel, A., Jotereau, F. & Cerottini, J.C. (1997). Cytolytic T lymphocyte recognition of the immunodominant HLA-A*0201-restricted Melan-A/MART-1 antigenic peptide in melanoma. *J Immunol*, **159**, 2366-74.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Dudley, M.E., Schwarz, S.L., Spiess, P.J., Wunderlich, J.R., Parkhurst, M.R., Kawakami, Y., Seipp, C.A., Einhorn, J.H. & White, D.E. (1998). Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med*, **4**, 321-7.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-91.
- Salter, R.D. & Cresswell, P. (1986). Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *Embo J*, **5**, 943-9.
- Saric, T., Chang, S.C., Hattori, A., York, I.A., Markant, S., Rock, K.L., Tsujimoto, M. & Goldberg, A.L. (2002). An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol*, **3**, 1169-76.

- Schatz, P.J. (1993). Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)*, **11**, 1138-43.
- Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W. & Bennink, J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, **404**, 770-4.
- Serrano, A., Tanzarella, S., Lionello, I., Mendez, R., Traversari, C., Ruiz-Cabello, F. & Garrido, F. (2001). Rexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer*, **94**, 243-51.
- Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R. & Shastri, N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature*, **419**, 480-3.
- Sette, A., Vitiello, A., Reheman, B., Fowler, P., Nayersina, R., Kast, W.M., Melief, C.J., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., Sidney, J., del Guercio, M.F., Southwood, S., Kubo, R.T., Chesnut, R.W., Grey, H.M. & Chisari, F.V. (1994). The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol*, **153**, 5586-92.
- Sgaramella, V., Van de Sande, J.H. & Khorana, H.G. (1970). Studies on polynucleotides, C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **67**, 1468-75.
- Shapiro, A.L., Vinuela, E. & Maizel, J.V., Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, **28**, 815-20.
- Shenoy, B.C. & Wood, H.G. (1988). Purification and properties of the synthetase catalyzing the biotinylation of the apoprotein of transcarboxylase from *Propionibacterium shermanii*. *Faseb J*, **2**, 2396-401.

- Sigal, L.J., Crotty, S., Andino, R. & Rock, K.L. (1999). Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature*, **398**, 77-80.
- Sim, B.C., Travers, P.J. & Gascoigne, N.R. (1997). V alpha 3.2 selection in MHC class I mutant mice: evidence for an alternate orientation of TCR-MHC class I interaction. *J Immunol*, **159**, 3322-9.
- Sinibaldi, D., Wharton, W., Turkson, J., Bowman, T., Pledger, W.J. & Jove, R. (2000). Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene*, **19**, 5419-27.
- Skipper, J.C., Gulden, P.H., Hendrickson, R.C., Harthun, N., Caldwell, J.A., Shabanowitz, J., Engelhard, V.H., Hunt, D.F. & Slingluff, C.L., Jr. (1999). Mass-spectrometric evaluation of HLA-A*0201-associated peptides identifies dominant naturally processed forms of CTL epitopes from MART-1 and gp100. *Int J Cancer*, **82**, 669-77.
- Sloan-Lancaster, J. & Allen, P.M. (1996). Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: molecular mechanisms and role in T cell biology. *Annu Rev Immunol*, **14**, 1-27.
- Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, **228**, 1315-7.
- Spee, P. & Neefjes, J. (1997). TAP-translocated peptides specifically bind proteins in the endoplasmic reticulum, including gp96, protein disulfide isomerase and calreticulin. *Eur J Immunol*, **27**, 2441-9.
- Stern, L.J. & Wiley, D.C. (1994). Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Behring Inst Mitt*, 1-10.

- Subbramanian, R.A., Moriya, C., Martin, K.L., Peyerl, F.W., Hasegawa, A., Naoi, A., Chhay, H., Autissier, P., Gorgone, D.A., Lifton, M.A., Kuus-Reichel, K., Schmitz, J.E., Letvin, N.L. & Kuroda, M.J. (2004). Engineered T-cell receptor tetramers bind MHC-peptide complexes with high affinity. *Nat Biotechnol*, **22**, 1429-34.
- Sykulev, Y., Joo, M., Vturina, I., Tsomides, T.J. & Eisen, H.N. (1996). Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity*, **4**, 565-71.
- Tomlinson, I.M., Walter, G., Jones, P.T., Dear, P.H., Sonnhhammer, E.L. & Winter, G. (1996). The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J Mol Biol*, **256**, 813-17.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4.
- Tsai, B., Ye, Y. & Rapoport, T.A. (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 246-55.
- Tynan, F.E., Burrows, S.R., Buckle, A.M., Clements, C.S., Borg, N.A., Miles, J.J., Beddoe, T., Whisstock, J.C., Wilce, M.C., Silins, S.L., Burrows, J.M., Kjer-Nielsen, L., Kostenko, L., Purcell, A.W., McCluskey, J. & Rossjohn, J. (2005). T cell receptor recognition of a 'super-bulged' major histocompatibility complex class I-bound peptide. *Nat Immunol*, **6**, 1114-22.
- Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E. & Lanzavecchia, A. (1995). Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature*, **375**, 148-51.
- Valmori, D., Fonteneau, J.F., Lizana, C.M., Gervois, N., Lienard, D., Rimoldi, D., Jongeneel, V., Jotereau, F., Cerottini, J.C. & Romero, P. (1998). Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol*, **160**, 1750-8.

- Valmori, D., Gileadi, U., Servis, C., Dunbar, P.R., Cerottini, J.C., Romero, P., Cerundolo, V. & Levy, F. (1999). Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3. *J Exp Med*, **189**, 895-906.
- Valmori, D., Levy, F., Miconnet, I., Zajac, P., Spagnoli, G.C., Rimoldi, D., Lienard, D., Cerundolo, V., Cerottini, J.C. & Romero, P. (2000). Induction of potent antitumor CTL responses by recombinant vaccinia encoding a melan-A peptide analogue. *J Immunol*, **164**, 1125-31.
- Van den Eynde, B.J. & van der Bruggen, P. (1997). T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol*, **9**, 684-93.
- van der Burg, S.H., Visseren, M.J., Brandt, R.M., Kast, W.M. & Melief, C.J. (1996). Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability. *J Immunol*, **156**, 3308-14.
- Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12142-9.
- von Leoprechting, A., van der Bruggen, P., Pahl, H.L., Aruffo, A. & Simon, J.C. (1999). Stimulation of CD40 on immunogenic human malignant melanomas augments their cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis and induces apoptosis. *Cancer Res*, **59**, 1287-94.
- Wang, J.H., Meijers, R., Xiong, Y., Liu, J.H., Sakihama, T., Zhang, R., Joachimiak, A. & Reinherz, E.L. (2001). Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10799-804.
- Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D., Dalton, W., Jove, R., Pardoll, D. & Yu, H. (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med*, **10**, 48-54.

- Weber, K.S., Donermeyer, D.L., Allen, P.M. & Kranz, D.M. (2005). Class II-restricted T cell receptor engineered in vitro for higher affinity retains peptide specificity and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 19033-8.
- Weigert, M., Perry, R., Kelley, D., Hunkapiller, T., Schilling, J. & Hood, L. (1980). The joining of V and J gene segments creates antibody diversity. *Nature*, **283**, 497-9.
- White, J., Crawford, F., Fremont, D., Marrack, P. & Kappler, J. (1999). Soluble class I MHC with beta2-microglobulin covalently linked peptides: specific binding to a T cell hybridoma. *J Immunol*, **162**, 2671-6.
- Whiteside, T.L. & Rabinowich, H. (1998). The role of Fas/FasL in immunosuppression induced by human tumors. *Cancer Immunol Immunother*, **46**, 175-84.
- Wilchek, M. & Bayer, E.A. (1990). Applications of avidin-biotin technology: literature survey. *Methods Enzymol*, **184**, 14-45.
- Wu, L.C., Tuot, D.S., Lyons, D.S., Garcia, K.C. & Davis, M.M. (2002). Two-step binding mechanism for T-cell receptor recognition of peptide MHC. *Nature*, **418**, 552-6.
- Wulfing, C. & Plückthun, A. (1994). Correctly folded T-cell receptor fragments in the periplasm of Escherichia coli. Influence of folding catalysts. *J Mol Biol*, **242**, 655-69.
- Yewdell, J., Anton, L.C., Bacik, I., Schubert, U., Snyder, H.L. & Bennink, J.R. (1999). Generating MHC class I ligands from viral gene products. *Immunol Rev*, **172**, 97-108.
- York, I.A., Goldberg, A.L., Mo, X.Y. & Rock, K.L. (1999). Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol Rev*, **172**, 49-66.
- Zamoyska, R. (1998). CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr Opin Immunol*, **10**, 82-7.

Zhong, G., Reis e Sousa, C. & Germain, R.N. (1997). Production, specificity, and functionality of monoclonal antibodies to specific peptide-major histocompatibility complex class II complexes formed by processing of exogenous protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13856-61.

VII Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden veröffentlicht in:

Gerhard Held *, Andreas Wadle *, Nina Dauth *, Guillaume Stewart-Jones, Christine Sturm, Markus Thiel, Carsten Zwick, Detlef Dieckmann, Gerold Schuler, Hennie R Hoogenboom, Frederic Levy, Vincenzo Cerundolo, Michael Pfreundschuh and Christoph Renner: **MHC-peptide Specific Antibodies Reveal Inefficient Presentation of an HLA-A*0201-restricted, Melan-A Derived Peptide after Active Intracellular Processing.** Eur. J. Immunol. 2007 Jul.37:2008–20

Gerhard Held *, Andreas Wadle *, Nina Dauth *, Guillaume Stewart-Jones, Christine Sturm, Markus Thiel, Carsten Zwick, Detlef Dieckmann, Gerold Schuler, Hennie R Hoogenboom, Frederic Levy, Vincenzo Cerundolo, Michael Pfreundschuh and Christoph Renner: **Correction: MHC-peptide Specific Antibodies Reveal Inefficient Presentation of an HLA-A*0201-restricted, Melan-A Derived Peptide after Active Intracellular Processing.** Eur J Immunol. 2008 May;38(5):1465-6

Nina Dauth, Jan Voswinkel, Christine Sturm, Andreas Wadle, Guillaume Stewart-Jones, Hennie R Hoogenboom, Vincenzo Cerundolo, Christoph Renner, Michael Pfreundschuh and Gerhard Held: **Increasing peptide binding to HLA-A*0201 by A/L substitution at p2 of Melan-A₂₆₋₃₅ provides higher affinity interaction of TCR-like molecules.** Zur Veröffentlichung anstehend.

*contributed equally

VIII Danksagung

Herrn Prof. Dr. Michael Pfreundschuh danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit im Onkologischen Labor der Inneren Medizin I zu erstellen. Ich bedanke mich auch für die stete Betreuung meiner Arbeit sowie insbesondere für die Möglichkeit einer Erweiterung meiner Arbeit im Rahmen einer hilfswissenschaftlichen Tätigkeit.

Herrn Prof. Dr. Christoph Renner danke ich für die Überlassung des interessanten Themas meiner Arbeit sowie für die stete Betreuung und Bereitschaft zur Diskussion bis zu seinem Weggang.

Herrn Dr. Gerhard Held danke ich für die Betreuung meiner Arbeit, die Einführung in das Thema und in die experimentellen Verfahrensweisen, die stete Bereitschaft zur Diskussion sowie die Begutachtung meiner Arbeit.

Frau Gabi Carbon danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit im Rahmen meiner Arbeit im Onkologischen Labor. Sie stand mir stets bei kleinen und größeren Problemen hilfreich sowie mit konstruktiver Kritik zur Seite.

Frau Christine Sturm danke ich für eine sehr schöne gemeinsame Zeit, in der viel gearbeitet, diskutiert, aber auch gelacht wurde und eine sehr gute Freundschaft gefestigt wurde.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. habil. R. Bernhardt des Instituts für Biochemie der Universität des Saarlandes danke ich für die Möglichkeit der Oberflächenplasmonresonanzmessungen im Rahmen meiner Arbeit.

Bei allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Onkologischen Labors möchte ich mich für eine gute Zusammenarbeit sowie ein sehr gutes Arbeitsklima bedanken. Bei Fragen oder Problemen fand sich zu jedem Zeitpunkt ein offenes Ohr.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir im Verlauf meines Studiums über sechs Jahre immer zur Seite standen und insbesondere diese Arbeit zu jedem Zeitpunkt mit stetem Interesse begleiteten, mich fortwährend motivierten und mit aller Kraft unterstützen.

Bei meinem Freund Björn Engelmann möchte ich mich sehr herzlich bedanken für die Geduld und das Verständnis, mit der er mein ganzes Studium und diese Arbeit begleitet hat und mir dabei stets motivierend zur Seite stand.

IX Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Dauth
Vorname:	Nina
Geburtsdatum:	14.03.1983
Geburtsort:	Zweibrücken
Anschrift:	Bergstraße 11 66503 Dellfeld
Familienstand:	ledig
Konfession:	evangelisch
Vater:	Horst Dauth, geb. am 01.06.1956 Beruf: Bankkaufmann
Mutter:	Hannelore Dauth, geb. Schäfer, geb. am 30.01.1957 Beruf: Bankkauffrau
Geschwister:	keine

Schul Ausbildung

06/1989 bis 06/1993	Grundschule in Dellfeld
07/1993 bis 03/2002	Helmholtz-Gymnasium in Zweibrücken
08.03.2002	Abitur

Hochschulstudium

10/2002 bis 12/2008	Medizinstudium an der
	Universität des Saarlandes in Homburg
02.09.2004	Physikumsprüfung (Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung)
02.12.2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktika / Famulaturen

22.04.2002 bis 14.06.2002	Krankenpflegepraktikum in der Abteilung für Innere Medizin im St. Elisabeth-Krankenhaus in Zweibrücken
22.07.2003 bis 04.08.2003	Krankenpflegepraktikum in der Neurochirurgie an der Universitätsklinik des Saarlandes in Homburg
21.02.2005 bis 21.03.2005	Famulatur in einer Chirurgiepraxis / D-Arztpraxis in Zweibrücken
01.08.2005 bis 30.08.2005	Famulatur in der Inneren Medizin im Universitäts-spital Basel/CH
13.03.2006 bis 12.04.2006	Famulatur in der Abteilung für Anästhesie im Evangelischen Krankenhaus in Zweibrücken
01.03.2007 bis 31.03.2007	Famulatur in der hämatologischen Ambulanz der Abteilung für Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie der Inneren Medizin der Universitätsklinik des Saarlandes in Homburg

Praktisches Jahr

20.8.2007 bis 09.12.2007	Abteilung für Innere Medizin im Universitätsspital Basel/CH
10.12.2007 bis 30.03.2008	Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Unfallchirurgie in der SHG-Klinik Merzig/Saar
31.03.2008 bis 20.07.2008	Abteilung für Neurologie in der SHG-Klinik Merzig/Saar

Promotion / wissenschaftliche Tätigkeit

Seit 04/2005	Promotion im Onkologischen Labor der Abteilung für Onkologie, Hämatologie, klinische Immunolo- gie und Rheumatologie der Inneren Medizin
01.07.2006 bis 30.07.2007	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft im Onko- logischen Labor der Abteilung für Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheu- matologie der Inneren Medizin

